

# PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

**J. BRACHET**  
BRUXELLES

**N. KAMIYA**  
OSAKA

**A. PISCHINGER**  
WIEN

**S. STRUGGER**  
MÜNSTER

HERAUSGEGEBEN VON

**JOSEF SPEK**  
ROSTOCK

**FRIEDL WEBER**  
GRAZ

**KARL HÖFLER**  
WIEN

**BAND LII, HEFT 4 (SCHLUSSHEFT)**

MIT 99 TEXTABBILDUNGEN

ABGESCHLOSSEN AM 22. AUGUST 1960



**WIEN**  
**SPRINGER-VERLAG**  
**1960**

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint zwanglos in einzeln berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 650 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung. Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

Prof. Dr. Fr. Weber, Pflanzenphysiologisches Institut, Graz, Schubertstraße 51, Österreich, oder

Prof. Dr. J. Speh, Zoologisches Institut, (3a) Rostock, Universitätsplatz, DDR, oder

Prof. Dr. K. Höfler, Pflanzenphysiologisches Institut, Wien I, Dr.-Karl-Lueger-Ring 1, Österreich, zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag in Wien I, Mölkerbastei 5

Fernsprecher: 63 96 14 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien.

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen, die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschreiten die Autorkorrekturen 10% der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfähig abgeliefert werden. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Farbige Abbildungen können nur auf Kosten des Autors angefertigt werden. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist im Interesse der Bezahler der Zeitschrift ein Kostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen im allgemeinen den Umfang von 1½ Druckbogen (24 Seiten) nicht überschreiten.

„Vorläufige Mitteilungen“ und Auseinandersetzungen polemischen Inhalts werden nicht angenommen. Grundsätzlich werden nur Arbeiten aufgenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen. Die Autoren erhalten 100 Separata ihrer Arbeit kostenlos und können maximal weitere 100 Separata zum angemessenen Preis beziehen. Die Bestellung muß mit dem dem Fahnenabsatz beigelegten Bestellzettel bei der Rücksendung der korrigierten Fahnen erfolgen.

Unkostenersatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

Der Verlag

LII. Band

Inhaltsverzeichnis

4. Heft

Abhandlungen

Neufahrt, A.: Untersuchungen über die Wirkungen von UV- und Röntgenstrahlen auf die Mitose des Eies von <i>Parascaris equorum</i> (Goeze) mit Hilfe des Zeitrafferfilms . . . . .	473
Sauer, H.: Über die Einwirkung von kurzwelligem Licht auf die basischen Vitalfarbstoffe Neutralrot, Pyronin und Janusgrün B . . . . .	518
Enöckl, F.: Über den Zustand des Plasmas in vakuolenkontrahierenden <i>Anchusa</i> -Zellen . . . . .	567
Rossner, W.: Licht- und elektronenoptische Untersuchungen über den Einfluß von Streptomycin auf <i>Sinapis alba</i> L. . . . .	580
Mitrakos, K.: Feinbau und Teilung bei Plastiden einiger Florideen-Arten . . . . .	611
Ziegler, Annemarie: Plastiden- und Stärke-Fluorochromierung mit Uranin . . . . .	618

Kurze Mitteilungen

Ryckowski, M.: Observations on the Osmotic Value of the Sap of the Central Vacuole of Ovules . . . . .	657
— Viscosity of Central Vacuole Sap of Ovules . . . . .	660

Sammelreferate

Pfeiffer, H. H.: Bericht über das Treffen der Biorheologen 1959 in Oxford (England) . . . . .	662
Kinzel, H.: Neuere Erkenntnisse über Energiewechsel und Makromolekülsynthese der Zelle . . . . .	669

<u>Referate</u> . . . . .	689
---------------------------	-----



# **Untersuchungen über die Wirkungen von UV- und Röntgenstrahlen auf die Mitose des Eies von *Parascaris equorum* (Goeze) mit Hilfe des Zeitrafferfilms**

Von

**Artur Neufahrt**

Aus dem Institut für Kinematische Zellforschung der Johann-Wolfgang-Goethe-  
Universität, Frankfurt am Main

Mit 36 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. Oktober 1959)

## **Inhaltsverzeichnis**

	Seite
I. Einleitung . . . . .	474
II. Material und Methoden . . . . .	477
III. Die Messung der Viskosität mit Hilfe der Granulabewegung . . . . .	480
1. Die Meßmethode der Granulabewegung . . . . .	481
2. Die Bestimmung des „Relativen Verschiebungsmittels“ (RVM) . . . . .	482
IV. Untersuchungen über die Wirkung von UV-Strahlen der Wellenlänge $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ auf die erste Teilung des <i>Parascaris</i> -Eies . . . . .	482
A. Der Einfluß des UV-Lichtes ( $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ ) . . . . .	482
1. auf die Teilungsverzögerung . . . . .	482
2. auf die Teilungsverzögerung bei einer Versuchstemperatur von $4^\circ \text{C}$ . . . . .	487
3. auf die Teilungsverzögerung; sowie die Wirkung einer Kälte- und Stickstoffnachbehandlung auf die Erholung bestrahlter <i>Parascaris</i> - Eizellen . . . . .	489
B. Der Einfluß von Stickstoff während der Bestrahlung auf die Erholung der Eizelle vom Strahlenschaden . . . . .	491
C. Untersuchungen über den Einfluß von UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ und einer Dosis von $5000 \text{ erg/mm}^2$ auf die Viskosität des Cytoplasmas . . . . .	492
D. Die Wirkung des UV-Lichtes der Brenner HQA 500 und HNS 12 . . . . .	495
1. auf die Viskosität während der Zellteilung . . . . .	495
2. auf den Ablauf des Durchschnürungsvorganges . . . . .	499
3. Die Absorption des UV-Lichtes der Hg-Brenner HQA 500 und HNS 12 durch das <i>Parascaris</i> -Ei . . . . .	502

V. Die Wirkung von Röntgenstrahlen auf die Viskosität während der Teilung der <i>Parascaris</i> -Eizelle . . . . .	505
VI. Theoretischer Teil . . . . .	505
VII. Zusammenfassung der Ergebnisse . . . . .	514
Literatur . . . . .	515

## I. Einleitung

Bestrahlungen lebender Zellen mit UV-Licht und ionisierenden Strahlen (Röntgen- oder Radiumstrahlen), verursachen eine Veränderung der Teilungszeit. Diese Entwicklungsverlangsamung wird in der Literatur durch den Begriff der Teilungsverzögerung charakterisiert, worunter man die größere Zeitdauer versteht, die eine bestrahlte Zelle zur Vollendung einer Zellteilung benötigt gegenüber einer unbestrahlten.

Die wertmäßige Größe der Teilungsverzögerung wird von zwei Faktoren bestimmt: 1. von der eingestrahnten Dosis (Intensität  $\times$  Zeit) und 2. bei UV-Bestrahlungen von der Wellenlänge  $\lambda$ . So steigt die Wirkung der einzelnen Spektrallinien auf die Teilungsverzögerung des *Parascaris*-Eies von  $+200\text{ m}\mu$  ausgehend, fast linear an, Fauré-Fremiet (1913), und erreicht ihr Maximum bei  $\lambda = 280\text{ m}\mu$ , einer Wellenlänge, die hauptsächlich vom Eiweiß absorbiert wird.

Diese Ergebnisse deuten zweifellos darauf hin, daß der „Sitz“ oder die „Ursache“ der Teilungsverzögerung im Plasma selbst zu suchen ist. Andere Autoren vermuten die Ursache der auftretenden Teilungsverzögerung in einer Schädigung des Kernes, wofür besonders die Versuche Henshaw und Francis (1946) zu sprechen scheinen. Sie besamten normale *Arbacia*-Eizellen mit röntgenbestrahlten Spermien und bestrahlte Eier mit unbestrahlten Spermien. Wurden bei diesen Versuchen gleiche Dosen eingestrahlt, dann erhielt man für beide Kombinationen die gleichen Verzögerungswerte. Die Versuche mit bestrahlten Spermien führten zu der Auffassung, daß die Teilungsverzögerung hauptsächlich dem Kern und nicht, wie man vorher geneigt war anzunehmen, dem Plasma zuzuschreiben sei. Die geringe Plasmamenge, die den Spermakern umgibt, kann wohl vernachlässigt werden. Diese Annahme fand ihre Bestätigung in den Ergebnissen strahlenbiologischer Untersuchungen an kernlosen *Arbacia*-Halbeiern; man erzeugt sie experimentell durch starkes Zentrifugieren normaler Eizellen. Bestrahlte man nun diese kernlosen Halbeier und besamte sie anschließend mit unbestrahlten Spermien, so kommt es auch hier zu normalen Furchungen, die keine Verzögerung im zeitlichen Teilungsablauf aufwiesen.

Beobachtungen an fixiertem Eimaterial (Henshaw 1940), lassen als Ursache der Teilungsverzögerung auf eine Verzögerung des mitotischen Geschehens im Prophasestadium schließen. Spätere Stadien sind nicht oder nur geringfügig verzögert.

Eine maximale Wirkung von Röntgenstrahlen auf die Teilungsverzögerung von *Arbacia*-Eizellen wurde von Henshaw und Cohen (1940) erzielt, wenn die Eizellen 10–15 Minuten nach der Besamung bestrahlt wurden. Nach diesem Zeitpunkt ist die Vorkernvereinigung vollständig, und die Mitose steht unmittelbar vor dem sichtbaren Einsetzen der Prophase. Die Wirkung der Strahlung auf die Teilungs-

verzögerung nimmt nach dieser empfindlichen Entwicklungsphase merklich ab. Beide Autoren konnten außerdem noch nachweisen, daß dieses Maximum zu Prophasebeginn mit sichtbaren Veränderungen der Plasmaviskosität und Permeabilität zusammenfiel.

Blum und Price (1950) bestrahlten *Arbacia*-Eizellen zu verschiedenen Zeiten nach der Besamung und nach der ersten Teilung mit UV-Licht eines Hg-Brenners. Bestrahlungen der Eizellen kurz nach der Besamung sowie zu Beginn eines Teilungsintervalls führten zu maximalen Verzögerungswerten. Bestrahlungen vor Teilungsbeginn der Zellen ließen eine Wirkung auf die Teilungsverzögerung vermissen. Demnach existiert innerhalb eines Teilungsintervalls eine Entwicklungsphase, nach deren Ablauf die Zelle für Bestrahlungen mit UV-Licht unempfindlich wird. Die Wirkung der Strahlung auf diese scheinbar „unempfindliche“ Phase zeigt sich jedoch bei der nächsten Teilung der bestrahlten Eizelle, die nun ihrerseits wieder verzögert ist.

Verfolgt man die Teilungsverzögerung bestrahlter, besamter *Arbacia*-Eizellen über den Zeitraum mehrerer Teilungen, so zeichnet sich eine deutliche Abnahme der Verzögerungswerte ab; die bestrahlte Zelle gewinnt bald wieder ihre normale Teilungsrate zurück und zeigt somit eine echte Strahlenerholung. Dieser Vorgang gehört zu den interessantesten, wenn auch nur sehr schwer zu erfassenden intrazellulären Reaktionen einer bestrahlten Zelle, da nun Kern und Plasma in einem aufeinander abgestimmten Zusammenwirken strahlengeschädigte oder zerstörte Moleküle zu regenerieren und wichtige Verbindungen neu zu synthetisieren vermögen. Einschränkend sei bemerkt, daß sich nicht alle bestrahlten Eizellen vom Strahlenschaden zu erholen vermögen.

So zeigen röntgenbestrahlte *Parascaris*-Eier (Cook 1959) keine Strahlenerholung.

Hinsichtlich ihrer Embryonalentwicklung, Cook (1959) und Evans (1950), weisen *Parascaris*-Eizellen, die man bis zu 6 Monaten im Kühlschrank bei einer Temperatur von 5°C aufbewahrt, durch die Ausbildung zahlreicher, jedoch pathologischer Embryonen zum Teil eine Strahlenerholung auf. Eine längere Einschränkung des metabolischen Geschehens nach der Bestrahlung scheint die Erholung röntgenbestrahlter *Parascaris*-Eizellen zu begünstigen.

Die Untersuchungen an röntgenbestrahlten *Ascaris-suum*-Eizellen (Bachofer und Pahl, 1955) stehen jedoch im völligen Widerspruch zu den Ergebnissen von Cook und Evans. Die Autoren stellten fest, daß eine Nachbehandlung bestrahlter Eizellen mit tiefen Temperaturen einer Erholung nicht förderlich ist, sondern daß die Zahl der überlebenden Embryonen verringert wird.

Mit Hilfe einer Stickstoff- und Cyanidnachbehandlung röntgenbestrahlter *Ascaris-suum*-Eizellen versuchten Pahl und Bachofer (1957) die erholungsfördernden, intrazellulären Reaktionen abzugrenzen und zu deuten. Die Autoren schließen aus ihren Versuchsergebnissen, daß die Erholung der Zelle offenbar an Reaktionen des respiratorischen Systems geknüpft ist. Die erhöhte Anzahl normaler Embryonen in Eizellen, die nach der Bestrahlung einer Stickstoff- bzw. einer Cyanidnachbehandlung unterworfen wurden, bestätigen ihre Vermutungen. Demnach müßte die Ausschaltung oxydativer Prozesse (Zellatmung mit Hilfe der eisenhaltigen Atmungsfermente), unter Aufrechterhaltung des anaeroben Stoffwechsels die Synthese wichtiger Verbindungen unterstützen, die zur Erholung der Zelle notwendig sind.

Das Aktionsspektrum der Teilungsverzögerung läßt auf eine Schädigung der Nukleoproteide und bestimmter Eiweiße als reaktionsauslösende Faktoren schließen. Hinzu kommt, daß außerdem erhebliche Mengen an Fetten und Ölen in der Zelle in besonderen Cytoplasmaeinschlüssen (Granulen) aufgespeichert

sind. Die Bestrahlung dieser Substanzen, besonders der ungesättigten Fettsäuren mit UV-Licht, führt zu Bestrahlungsprodukten (Peroxyden), die die Zelle zu schädigen vermögen. Sie beeinflussen den Teilungsablauf und verursachen abnorme Gestaltsveränderungen, Wilbur, Wolfson u. a. (1957).

Man kann wohl nicht daran zweifeln, daß hierbei Veränderungen der Viskosität des Cytoplasmas auftreten. Leider wurden den Viskositätsänderungen bestrahlter Zellen in den letzten Jahren nur wenige Untersuchungen gewidmet.

Ein wichtiges Hilfsmittel für derartige Untersuchungen ist der Zeitrafferfilm, der es gestattet, Veränderungen festzustellen, die bereits während der Bestrahlung auftreten, noch bevor sie durch morphologische Veränderungen sichtbar werden.

Bei der Beobachtung der Strahlenreaktion auf Eiweiße, Clark (1956) und Gentner (1950), sind drei wichtige Teilreaktionen zu erwähnen: 1. die Denaturierung, 2. die vom pH-Wert abhängige Koagulation und 3. die Ausflockung des koagulierten Eiweißes. Koagulation und Ausflockung sind von der Temperatur abhängig; die Denaturierung, die ein rein photochemischer Prozeß (Veränderung der Eiweißmoleküle) darstellt, ist von der Temperatur unabhängig.

Pomini (1957), der die Wirkung von Radiumstrahlen auf das Cytoplasma bei *Parascaris equorum* mikrokineematographisch untersuchte, fand, daß sich die Schädigung dieser  $\gamma$ -Strahlung durch eine Viskositäts-erhöhung anzeigte, die durch eine Intensitätsabnahme der Granulabewegung charakterisiert war.

Wie an UV-bestrahltem *Spirostomum ambiguum* nachgewiesen werden konnte (Chirley und Finley 1948–1949), erhöht sich mit steigender Dosis die Viskosität des Protoplasmas. Eine Dosis-Erhöhung über 78 Sek. führte schließlich zur Koagulation.

Der Viskositätsänderung in *Arbacia*-Eizellen wurde von Wilson (1950) eine Reihe von Untersuchungen gewidmet. Die Kenntnis der Heparinwirkung auf die Zellteilung, Heilbrunn und Wilson (1949), veranlaßte ihn, die nach der Röntgenbestrahlung aufgetretene und sich über 20 Minuten erstreckende Viskositäts-erhöhung einer Diffusion von Heparin (Seeigeleier sind reich an Heparin) aus der Zelle in das Außenmedium (Seewasser) zuzuschreiben.

Es soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich von den oben dargestellten Ergebnissen Parallelen zu den Reaktionen von Eizellen des Nematoden *Parascaris equorum* aufzeigen lassen. Mit Hilfe des Zeitrafferfilms (Teilbildanalyse) und der Zentrifugierung sollen die Wirkungen von UV-Licht verschiedener Spektralbereiche und der Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$  sowie von Röntgenstrahlen auf die Viskosität vor und während der Teilung, ebenso der Teilungsverlauf genau untersucht und einem quantitativen Vergleich zugänglich gemacht werden. Auftretende wertmäßige Unterschiede innerhalb der Wirkungen des UV-Lichtes verschiedener Spektralbereiche und der Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$  sollen durch Absorptionsmessungen untersucht und erklärt werden.

Meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. W. Kuhl, danke ich herzlich für die Stellung dieser Aufgabe, für die Aufgeschlossenheit gegenüber deren Problematik und die großzügige Unterstützung in der Beschaffung der notwendigen Brenner, Meßinstrumente und Filter. Ebenso herzlich danke ich seiner Gattin und Mitarbeiterin, Frau Gertrud Kuhl, für ihre förderliche Kritik.

Weiterhin danke ich den Herren Professoren Giersberg und Kaplan und den Herren Privatdozenten Hanke, Lotz und Merkel für die freundliche Unterstützung.

Außerdem gebührt Dank den Herren Dr. Stabe und Dr. Monden von der Firma Hartmann & Braun, ferner den Firmen Siemens & Reiniger, Preßler sowie Kipp u. Zonen.

## II. Material und Methoden

Den befruchteten *Parascaris*-Weibchen aus frisch geschlachteten Pferden wurde 1,5 cm des vorderen zweiteiligen Uterus herauspräpariert und abgetrennt. Diese Uterusteile wurden in kleine Gläschen, die eine Citropepsinlösung zum Entfernen der optisch störenden Schleimschicht enthielten, gebracht und im Kühlschrank bei  $+4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Konzentration der Citropepsinlösung war derart, daß sich bereits nach vier Tagen die abgedauten, gereinigten Eizellen am Boden des Glases ansammelten. Cytologische Untersuchungen ergaben, daß sich alle Eizellen dieser Uterusabschnitte im Vorkernstadium befanden.

Bei Versuchsbeginn wurden die Eier dem Kühlschrank entnommen und nach Angleichung der Zellen an die Raumtemperatur mit destilliertem Wasser mehrmals gewaschen.

Die Brauchbarkeit der Eizellen eines Uterus für Bestrahlungsversuche wurde jeweils in Vorversuchen nachgeprüft. Teilten sich etwa 200 Eier synchron zur gleichen Zeit, so konnten die Eizellen des betreffenden Uterus verwandt werden. *Parascaris*-Eier aus Uteri, die sich nicht synchron teilten, wurden verworfen.

Die Bestrahlung der *Parascaris*-Eier im Vorkernstadium erfolgten mit dem Hg-Niederdruckbrenner HNS 12 (Osram), der hauptsächlich die Wellenlänge  $\lambda = 253,7\text{ m}\mu$ , die Resonanzlinie des Quecksilbers, aussendet. Zur Messung der Strahlungsintensität fand eine geeichte Pressler-Photozelle Verwendung, die mit einer Natriumschicht ausgestattet war. Sie betrug  $25\text{ erg/mm}^2/\text{sec}$ .

Obwohl die Primärreaktion der UV-Strahlung ein rein photochemischer, von der Temperatur unabhängiger Prozeß ist, hat sich bei Untersuchungen über die Strahlenempfindlichkeit der *Parascaris*-Eizelle (Dognon 1948) doch eine Temperaturunabhängigkeit gezeigt. Aus diesem Grunde war es erforderlich, für das gesamte Eimaterial gleiche Bestrahlungsbedingungen zu schaffen; sämtliche Eizellen wurden bei einer Temperatur von  $20 \pm 0,5^{\circ}$  bestrahlt. Ein von Kuhl konstruierter Temperiertisch, der an einen Höppler-Thermostaten angeschlossen war, gewährleistete die Einhaltung der geforderten Temperatur.

Zur Bestimmung der Teilungsverzögerung wurde eine 50%ige Teilungsrates für günstig erachtet; hierdurch wurden zeitliche Teilungsunterschiede der Eier eines Bestrahlungsgefäßes (Salznapf) ausge-

glichen. Mit Hilfe einer Kapillare wurde jeweils bis zu einer konstanten Marke eine gleichmäßige Menge der Eizellensuspension herauspipettiert, so

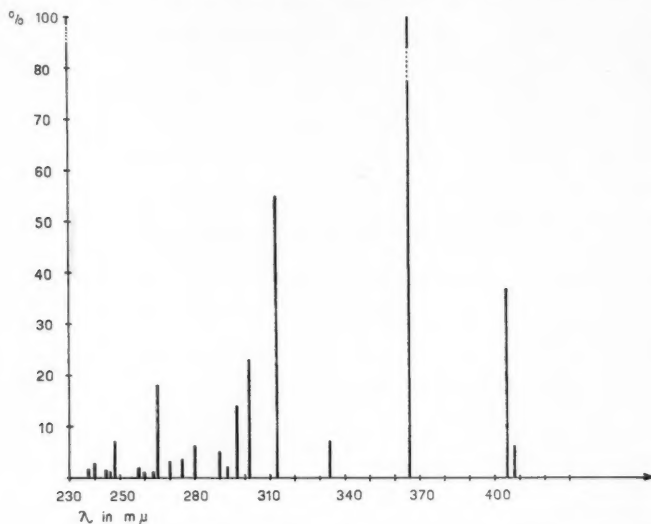


Abb. 1. Die relative spektrale Energieverteilung des Hg-Hochdruckbrenners HQA 500. Ordinate = Energieanteil in %. Abszisse = in  $m\mu$ .

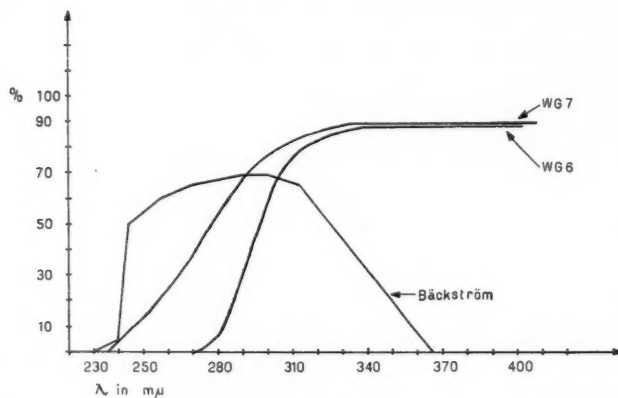


Abb. 2. Die spektralen Durchlässigkeiten der verwandten UV-Filter. Ordinate = Durchlässigkeit in %. Abszisse = Wellenlänge in  $m\mu$ .

daß jedes Strahlungsgefäß ungefähr 2000 Eier enthielt. Der Zeitpunkt, an dem sich nun 50% der Eizellen geteilt hatten, wurde als Meßwert in das



Versuchsprotokoll eingetragen. Nach der Teilung der Kontrollen wurden die bestrahlten Eizellen alle halbe bis eine Stunde beobachtet und gezählt. Um innerhalb einer relativ kurzen Zeitspanne zu einem Ergebnis zu kommen, wurden die Bestrahlungsgefäße auf eine Glasplatte mit einer quadratischen Einteilung gestellt, die Eizellen-Anzahl von zehn Quadraten bestimmt und der Mittelwert aus den erhaltenen Ergebnissen berechnet. Auf diese Weise war es möglich, in kurzer Zeit eine Versuchsserie durchzuzählen.

Zur Viskositätsmessung während der Teilung mit Hilfe der Granulabewegung wurden die bestrahlten Eier mit der Zeitrafferkamera nach Kuhl (E. Leitz) aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit dem Leitz-

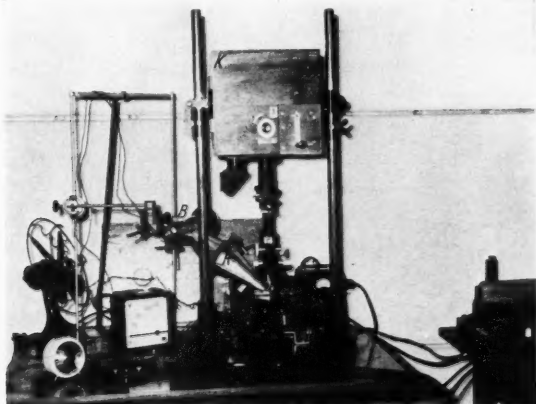


Abb. 5. Gesamtversuchsanordnung. K = Kamera, B = Hg-Brenner in einem Reflektor eingeschlossen, R = Reflektoren.

Objektiv 6L und U55 X, dem Periplanokular 10 $\times$ , dem Filter OG 5 (Schott) bei einer Belichtungszeit je Teilbild von einer Sekunde und einer Monla-Stromstärke von 5,5 Ampere hergestellt. Es wurde auf  $\frac{1}{100}$  gerafft, das sind 6 Bilder je Minute.

Sämtliche Bestrahlungsversuche erfolgten in einem mit Gelblicht ausgestatteten Labor, um eine Photoreaktivierung der bestrahlten Eizellen zu vermeiden. Aus dem gleichen Grunde wurde auch zur Aufnahme das Orangefilter OG 5 (Schott) verwandt statt des für die Aufnahme lebender Zellen meist verwandten Grünfilters VG 4 (Schott).

Die Viskositätsbestimmungen des Cytoplasma mit Hilfe der Zentrifugierung wurden mit einer Christ-Zentrifuge (6000 U/min) durchgeführt.

Zur Bestrahlung der Eizellen während der Teilung bei gleichzeitiger Zeitraffer-Filmaufnahme dienten der Hg-Hochdruckbrenner HQA 500 (Osram) und der Hg-Niederdruckbrenner HNS 12 (Osram). In Abb. 1 ist die relative spektrale Energieverteilung des HQA-500-Brenners in ein Koordinatensystem eingetragen. Die Energieanteile der einzelnen Spektrallinien

sind auf den Energieanteil der Wellenlänge  $\lambda = 366 \text{ m}\mu$  bezogen, der gleich 100% gesetzt wurde.

Zur Begrenzung der emittierten Wellenlängen wurden drei Filterkombinationen verwandt: 1. Bäckström-Filter ( $\text{NiSO}_4$  und  $\text{CoSO}_4$ ), 2. Bäckström- und WG 6-Filter (Schott) und 3. Bäckström- und WG 7-Filter (Schott). Die spektralen Durchlässigkeiten dieser Filter sind in Abb. 2 dargestellt. Die Messungen der Durchlässigkeit sowie der spektralen Energieverteilung wurden mit einem Spektralphotometer (Zeiss-Opton M 4 Q) durchgeführt.

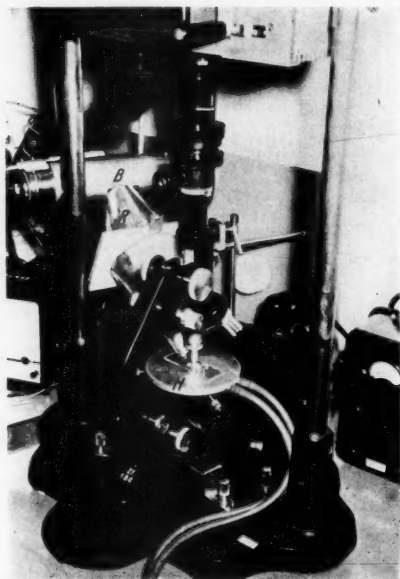


Abb. 4. Versuchsanordnung.  $R$  = kegelschalenförmiger Reflektor,  $B$  = Brenner,  $H$  = Temperiertisch.

Da für die UV-Bestrahlungen bei gleichzeitiger Zeitrafferaufnahme keine geeignete Quarzoptik zur Verfügung stand, mußte ein Reflektor angefertigt werden, der die UV-Strahlung gerichtet auf das zu bestrahlende Objekt lenkte.

Am besten hat sich ein doppelt kegelschalenförmiger Reflektor (Abb. 4) aus Al-Blech bewährt. Diese beiden Kegel waren auf eine Filterhaltervorrichtung geschraubt, die einen Halterahmen für das WG-Filter und das Flüssigkeitsfilter (Bäckström) trug. Die Abb. 3 und 4 zeigen den Aufbau der gesamten Apparatur.

Die Röntgenbestrahlungen erfolgten mit einer wassergekühlten Röhre der Firma Seifert & Co. Der Fokusabstand betrug 16 cm, die Anodenspannung 50 kV und der Heizstrom 30 mA. Bei dem

erwähnten Fokusabstand und dem Al-Filter 0,5 mm betrug die Intensität der Strahlung 1600 r/min.

### III. Die Messung der Viskosität mit Hilfe der Granulabewegung

Die Granulabewegung = GB ist im *Parascaris*-Ei, wie in den meisten lebenden Zellen, nur unter Änderung des Zeitfaktors, d. h. im Zeitrafferfilm sichtbar. Im Laufbild erscheint sie als ein ungeordnetes Hin- und Hertanzen der Granulen und erinnert stark an eine Brownsche Molekularbewegung. Die verschiedene Größe der Granulen sowie die kolloidale Beschaffenheit des Cytoplasma lassen jedoch keinen direkten und physikalisch haltbaren Vergleich zwischen Brownscher Bewegung und der Granulabewegung zu, da diese nur unter Zeitraffung sichtbar ist.

Bei Untersuchungen über die Entwicklung von Eizellen von Vertretern verschiedener Tiergruppen (Nematoden, Echinodermen, Säuger u. a.) mit Hilfe des Zeitrafferfilms, Kuhl (1937—1949), wurde die Granulabewegung sorgfältig analysiert.

Die Ergebnisse der Teilbildanalyse zeigten, daß die Granulabewegung als ein Indikator der jeweils herrschenden Viskosität und der Vitalität der Zelle angesehen werden kann.

Die Möglichkeit, durch die Intensität der Granulabewegung auf die Viskosität und Vitalität der Zelle schließen zu können, macht sie zu einem wichtigen Indikator für Zellschädigungen, sei es durch chemische Agenzien, elektrischen Strom, Ultraschall und Strahlen verschiedener Art, noch bevor die eingetretenen Schädigungen sichtbar werden.

Wird ein *Parascaris*-Ei ultrazentrifugiert, Lamina (1958), so tritt, entsprechend der verschiedenen spezifischen Gewichte der Zelleinschlüsse, eine Schichtung des Eimaterials in vier Zonen ein.

Am zentrifugalen Pol der Eizelle liegen die spezifisch schwersten Granula, die einen Durchmesser von  $0,1-0,3 \mu$  aufweisen. Daran schließt sich eine einschlußfreie Schicht mit den beiden Vorkernen bzw. dem Zellkern an. Auf diese folgt eine Zone größerer Zelleinschlüsse, die man als Sphärulen bezeichnet; es soll sich bei diesen Zelleinschlüssen wahrscheinlich um Vakuolen handeln. Am zentripetalen Pol der Eizelle liegen die leichtesten Cytoplasmainschlüsse. Ihr Durchmesser beträgt etwa  $1 \mu$ ; sie stellen die Öl- und Fettspeicher der *Parascaris*-Eizelle dar.

Wenn im Verlaufe dieser Untersuchungen von Granula und Granulabewegung gesprochen wird, so handelt es sich nur um diese  $1 \mu$  großen leichtesten Plasmainschlüsse.

### 1. Die Meßmethode der Granulabewegung

Die Morphologie einer *Parascaris*-Eizelle (Plasmakugel, perivitelliner Raum und Eischale) deutet nicht auf ein „starres“ biologisches System hin. Bewegungen der Eizelle (Plasmakugel) um beliebige Eiaachsen und Verlagerungen im perivitellinen Raum können gelegentlich sogar subjektiv im Mikroskop beobachtet werden. Diese Drehbewegungen und Lageveränderungen der Eizelle im perivitellinen Raum, werden vielleicht durch intrazelluläre Umschichtungen verschieden schwerer Eimaterialien ausgelöst. Sollen nun Bewegungsvorgänge in einem derartigen Ei gemessen werden, so ist es erforderlich ein Verfahren anzuwenden, das auftretende Eigenbewegungen der Eizelle weitgehend auszuschalten gestattet. Am geeignetsten hat sich das „Relative Verschiebungsmittel“, Einstein (1922), erwiesen.

Es ist definiert als die auf eine Ebene projizierte mittlere Lageverschiebung von sichtbaren Teilchen in der Zeiteinheit.

Das „Relative Verschiebungsmittel“ wurde zuerst von Schwöbel (1951) zur Untersuchung der Viskosität des Cytoplasma in *Parascaris*-Eizellen mit Erfolg angewandt.

## 2. Die Bestimmung des „Relativen Verschiebungsmittels“ (RVM)

Die Anfangslage der Granula zur Zeit  $t = 0$  wird in das von dem Film-Auswertgerät auf Transparentpapier projizierte Teilbild  $Tb = 0$  eingezeichnet. Nun dreht man den Filmstreifen, falls das RVM auf die Zeiteinheit eine Minute bezogen werden soll, um die diesem Zeitintervall entsprechende Teilbilderzahl  $Tb = x$  weiter und markierte die Endlage der Granulen. Durch das Vermessen der Ausgangslage mit der Endlage jedes einzelnen Granulums wird der zurückgelegte Weg = relative Verschiebung in Mikron erhalten. Es wurden zur Bestimmung des RVM einer Minute die Anfangs- und Endlagen von jeweils 20 Granulen ausgemessen; ungefähr 200 Einzelmessungen waren für die Ermittlung des RVM für den Zeitraum von einer Minute erforderlich.

Durch dieses Verfahren werden Drehungen der Eizelle parallel zur optischen Achse sowie Verlagerungen der Zelle im perivitellinen Raum senkrecht zur optischen Achse ausgeschaltet.

## IV. Untersuchungen über die Wirkungen von UV-Strahlen der Wellenlänge $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ auf die erste Teilung des *Parascaris*-Eies

### A. Der Einfluß des UV-Lichtes

#### 1. Der Einfluß des UV-Lichtes der Wellenlänge $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ auf die Teilungsverzögerung

Aus einer Suspension von Eizellen wurde stündlich (nach der bereits besprochenen Methode) eine konstante Menge herauspipettiert und bis zum Teilungsbeginn mit UV-Licht der Dosen 750, 1500 und 3000 erg/mm<sup>2</sup> bestrahlt. Der Verlauf der Werte für die Teilungsverzögerung ist in den Abb. 5 und 6 graphisch dargestellt. Auf der Ordinate ist die Teilungsverzögerung in Minuten, auf der Abszisse der jeweilige Zeitpunkt der Bestrahlung in Stunden nach der Kühlschränkentnahme der Eizellen abgetragen.

In beiden Abbildungen hat die Bestrahlung der Eizellen unmittelbar nach Kühlschränkentnahme die größte, die Bestrahlung der Eier 8 Stunden nach Entnahme keine Wirkung auf die Dauer des untersuchten Intervalls. Die Teilungsverzögerung verhält sich also umgekehrt proportional zur Zeit, gemessen von der Kühlschränkentnahme der Eizellen bis zur Bestrahlung. Die Schnittpunkte der Kurven mit der Abszisse begrenzen Entwicklungsphasen, nach deren Ablauf die Zellen für UV-Strahlen in bezug auf die erste Teilung nicht mehr empfindlich sind. Alle nach diesen Phasen bis zum Teilungsbeginn in den gleichen Zeitabständen bestrahlten Eizellen teilen sich unverzögert zur gleichen Zeit wie die unbestrahlten Kontrollen. Die Ausdehnung der empfindlichen Phase (Abszisse) wird von der eingestrahlten Dosis bestimmt; ihr Wert beträgt in Abb. 5 für eine Dosis von 750 erg 4 Stunden, für 1500 erg 5 Stunden und für 3000 erg/mm<sup>2</sup> 6 Stunden. In Abb. 6 tritt diese Abhängigkeit des strahlenempfindlichen Bereichs von der Dosis nicht so deutlich hervor; die empfindliche Phase ist für 750 und 1500 erg/mm<sup>2</sup> gleich groß.

Bemerkenswert sind auch die hohen Verzögerungswerte in Abb. 6. Diese

Reaktionsunterschiede sind dadurch bedingt, daß hier Eier von Würmern aus zwei verschiedenen Pferden verwandt wurden, deren Habitus (Pferd 1

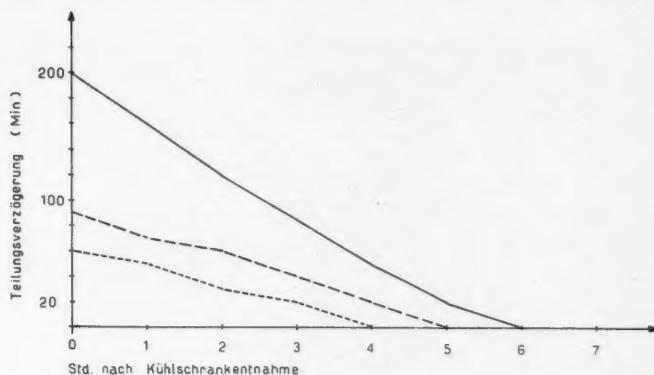


Abb. 5. Der Verlauf der Teilungsverzögerung UV-bestrahlter *Parascaris*-Eizellen.  
 $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ . Pferd 1.

Kurve ----- 750 erg/mm<sup>2</sup>, Kurve - - - 1500 erg/mm<sup>2</sup>. Kurve — 3000 erg/mm<sup>2</sup>.

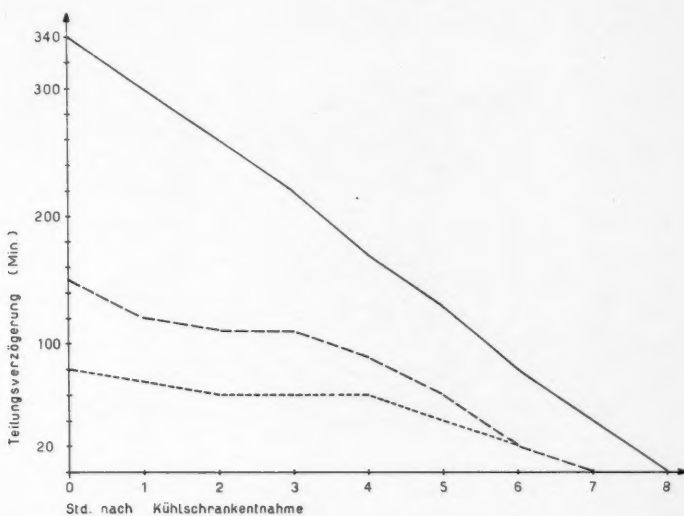


Abb. 6. Der Verlauf der Teilungsverzögerung UV-bestrahlter *Parascaris*-Eizellen.  
Kurve ----- 750 erg/mm<sup>2</sup>, Kurve - - - 1500, Kurve — 3000 erg/mm<sup>2</sup>. Pferd 2.

gut genährt und Pferd 2 mager) für die Entwicklung der Würmer und letztlich für deren Eizellen vielleicht von Einfluß sein könnte. Um in den folgenden Versuchen diese zusätzliche Fehlerquelle auszuschalten, wurden alle

Bestrahlungsversuche nur an Eizellen aus Würmern des gleichen Pferdes vorgenommen.

Wird die Weiterentwicklung der Eizellen verfolgt, die sich in bezug auf

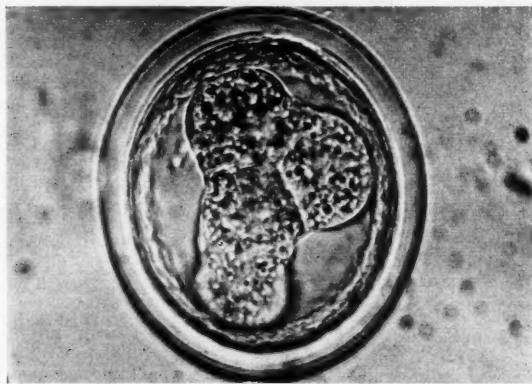


Abb. 7. Geschädigtes T-Stadium. UV:  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ . Dosis =  $5000 \text{ erg/mm}^2$ .

UV-Strahlen (Dosis =  $5000 \text{ erg/mm}^2$ ) als „unempfindlich“ erwiesen, dann treten neben einer beachtlichen Teilungsverzögerung des

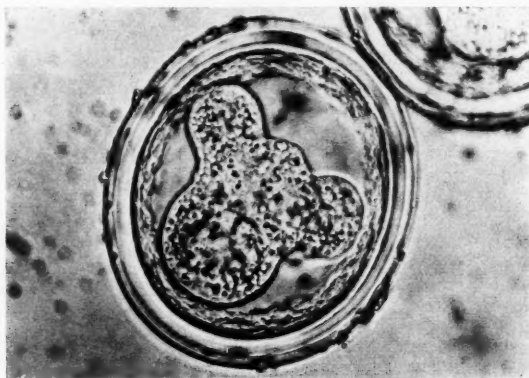


Abb. 8. Ein durch die UV-Strahlung stark geschädigtes T-Stadium.  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ . Dosis =  $5000 \text{ erg/mm}^2$ .

Zweizellen- in das T-Stadium bereits die ersten morphologischen Veränderungen (Abb. 7 und 8) sichtbar in Erscheinung.

Diese Versuche wurden ausschließlich mit Eizellen durchgeführt, die bis zu vier Tagen bei einer Temperatur von  $4^\circ \text{C}$  aufbewahrt wurden.

Zur Untersuchung der Frage nach dem Einfluß des Zellalters auf die Teilungsverzögerung wurden *Parascaris*-Eizellen 7, 14, 30 und 70 Tage nach



der Uterusentnahme mit UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$  (Dosis:  $3000 \text{ erg/mm}^2$ ) in der bisherigen Weise bestrahlt. Die Abb. 9, 10, 11 und 12

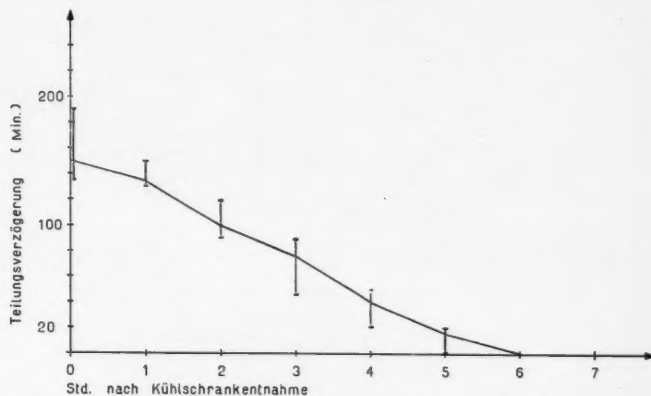


Abb. 9. Der Verlauf der Teilungsverzögerung UV-bestrahlter *Parascaris*-Eizellen 7 Tage nach Uterusentnahme. Dosis =  $3000 \text{ erg/mm}^2$ . Wellenlänge  $\gamma = 253,7 \text{ m}\mu$ .

veranschaulichen die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Bei Eizellen, die bis 30 Tage lang in einer Temperatur von  $4^\circ \text{C}$  aufbewahrt wurden, tritt keine Veränderung der Linearität der Verzögerungswerte ein, d. h., daß in diesen

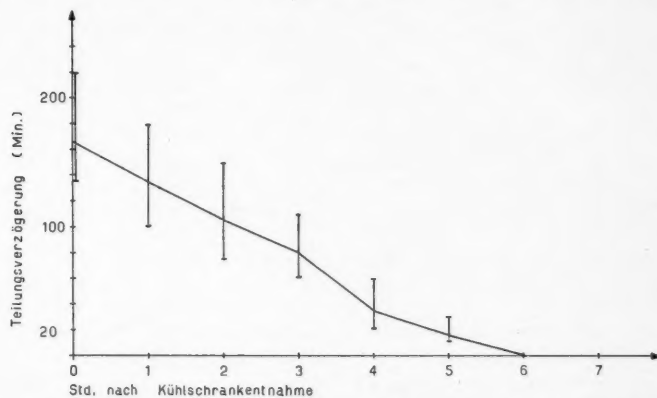


Abb. 10. Der Verlauf der Teilungsverzögerung UV-bestrahlter *Parascaris*-Eier 14 Tage nach Uterusentnahme. Dosis =  $3000 \text{ erg/mm}^2$ . Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ .

Grenzen gehaltene Zellalter hat keinen Einfluß auf die Teilungsverzögerung.

Eine deutliche Abhängigkeit der Teilungsverzögerung vom Zellalter zeigen die in Abb. 12 dargestellten Versuchsergebnisse.

Der lineare Verlauf der Verzögerungswerte wird nunmehr durch einen halb-parabolischen abgelöst.

Wie bereits in der Einleitung dargelegt wurde, erreicht die Teilungs-

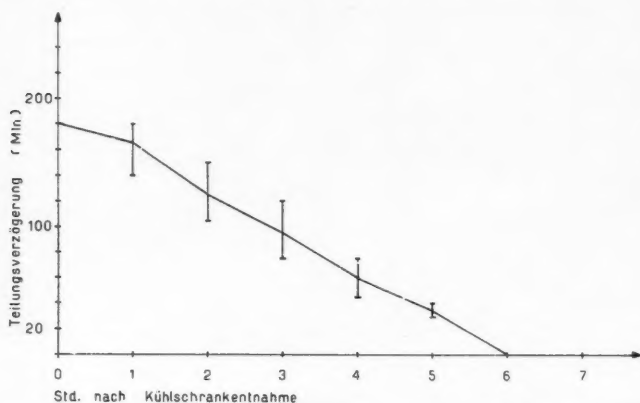


Abb. 11. Der Verlauf der Teilungsverzögerung UV-bestrahlter *Parascaris*-Eier 50 Tage nach Uterusentnahme. Dosis = 3000 erg/mm<sup>2</sup>. Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ .

verzögerung röntgen- und UV-bestrahlter *Arbacia*-Eizellen ihr Maximum zur Zeit des sichtbaren Einsetzens der Prophase. Dieses Maximum der Strahlenempfindlichkeit wertet Lea (1947) als den sichtbaren Effekt eines

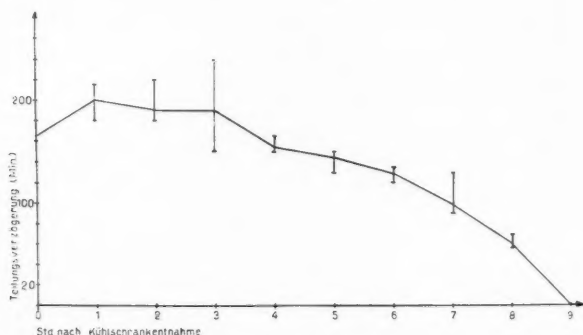


Abb. 12. Der Verlauf der Teilungsverzögerung UV-bestrahlter *Parascaris*-Eier 70 Tage nach Uterusentnahme. Dosis = 3000 erg/mm<sup>2</sup>. Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ .

Erholungsvorganges. Werden mehrere Teilungen bestrahlter *Arbacia*-Eizellen verfolgt, und die Verzögerungswerte registriert, so stellt man eine stetige Größenabnahme dieser Werte fest. Nach der dritten Teilung stellt sich gewöhnlich die art eigene Teilungsrate wieder ein. Die bestrahlte *Arbacia*-Eizelle zeigt also eine echte Erholung vom Strahlenschaden.

UV-bestrahlte *Parascaris*-Eier können sich nicht vom Strahlenschaden erholen; sämtliche Eizellen zeigen während der ersten Teilungen keine Änderung der Verzögerungswerte und entwickeln sich nur zu pathologischen



Abb. 13. Pathologische Vielzellhaufen. Dosis = 3000 erg/mm<sup>2</sup>. Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ .

Zellhaufen, die absterben, nachdem ein gewisses Entwicklungsstadium erreicht wurde. In den Abb. 13, 14 und 15 sind einige charakteristische, pathologische Vielzellhaufen dargestellt.



Abb. 14. Pathologische Vielzellhaufen. Dosis = 3000 erg/mm<sup>2</sup>. Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ .

## 2. Der Einfluß des UV-Lichtes der Wellenlängen $= 253,7 \text{ m}\mu$ auf die Teilungsverzögerung bei einer Versuchstemperatur von 4° C

In dem vorangegangenen Abschnitt wurde bewiesen, daß die Teilungsverzögerung von der Dosis (Abb. 5 und 6) und mehr oder weniger von

dem Zellalter (Abb. 9, 10, 11 und 12), worunter die Zeitdauer der Kühlschranksaufbewahrung verstanden werden soll, bestimmt wird. Bei all diesen



Abb. 15. Pathologische Vielzellhaufen. Dosis = 3000 erg/mm<sup>2</sup>. Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ .

Versuchen blieb jedoch ein wichtiger Faktor, nämlich die Temperatur, unberücksichtigt. Sie ist neben anderen Faktoren wie Sauerstoff und ausreichende Nährstoffversorgung für die intrazellulären Reaktionen und damit für die Aufrechterhaltung des Lebens von größter Bedeutung. In den nun folgenden Versuchen soll die Wirkung der UV-Strahlen bei niedriger Tempe-

ratur auf die Teilungsverzögerung des *Parascaris*-Eies untersucht werden.

Die dem Kühlschrank entnommenen Eier wurden mit destilliertem Wasser gewaschen und bei  $22 \pm 1^\circ \text{C}$  bis zum jeweiligen Bestrahlungsbeginn belassen. Vor

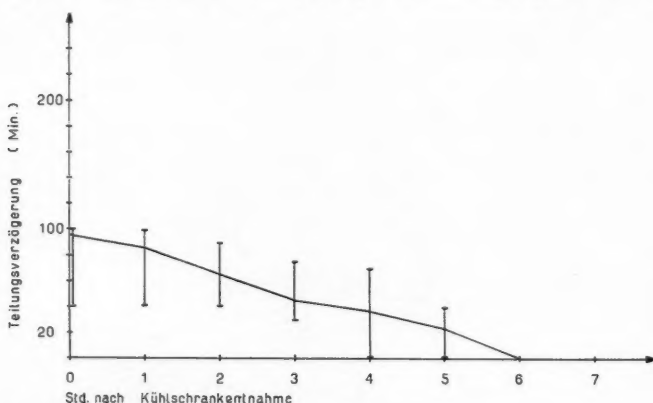


Abb. 16. Der Einfluß der UV-Bestrahlung während einer Temperatur von  $4^\circ \text{C}$  auf die Teilungsverzögerung von *Parascaris*-Eizellen. Bestrahlungstemperatur =  $4^\circ \text{C}$ . Dosis = erg/mm<sup>2</sup>. Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ .

jeder Bestrahlung wurde eine größere Zahl von Eizellen (2000) aus der Suspension entnommen, auf  $4^\circ \text{C}$  abgekühlt und im Kühlschrank mit UV der Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$  (Dosis = 3000 erg/mm<sup>2</sup>) bestrahlt. Die Weiterentwicklung dieser bestrahlten Eier erfolgte bei  $22 \pm 1^\circ \text{C}$ .

Die Verzögerungswerte bestrahlter Eizellen aus acht Versuchsserien (Abb. 16) zeigen eine beachtliche Verminderung der Teilungsverzögerung. Verglichen mit den Werten der bei  $20 \pm 0,5^\circ \text{C}$  bestrahlten Zellen sinkt der Maximalwert der Verzögerung der bei  $4^\circ \text{C}$  bestrahlten Eizellen um die Hälfte, von 200 auf 100, ab. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die Zelle in einer Art Ruhezustand von der UV-Strahlung in einem weit geringeren Maße geschädigt wird als bei  $20 \pm 0,5^\circ \text{C}$ .

Wahrscheinlich besteht ein direkter Zusammenhang der Metaboliten-tätigkeit mit der UV-Schädigung.

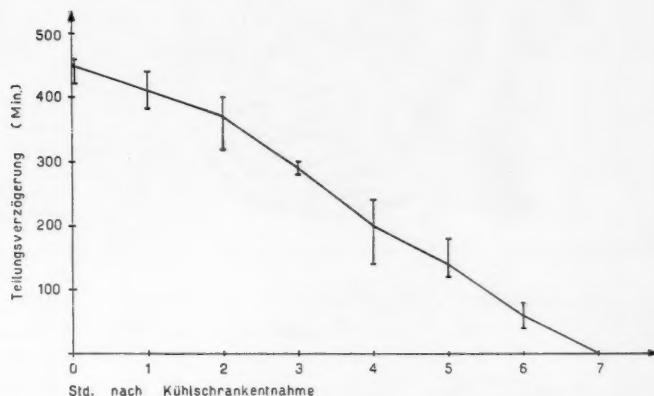


Abb. 17. Der Einfluß einer Kältenachbehandlung auf die Teilungsverzögerung UV-bestrahlter *Parascaris*-Eizellen. Nachbehandlungstemperatur =  $4^\circ \text{C}$ . Dosis =  $5000 \text{ erg/mm}^2$ . Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ .

### 3. Der Einfluß des UV-Lichtes der Wellenlänge $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ auf die Teilungsverzögerung sowie die Wirkung einer Kälte- und Stickstoffnachbehandlung auf die Erholung bestrahlter *Parascaris*-Eizellen

Zur Untersuchung der Wirkung einer Kältenachbehandlung auf UV-bestrahlte Eizellen wurden die Eier bei  $20 \pm 0,5^\circ \text{C}$  bestrahlt und sofort für 3 Tage in eine Temperatur von  $4^\circ \text{C}$  gebracht. Nach Ablauf dieser Zeitspanne erfolgte ihre Weiterentwicklung bei  $22 \pm 1^\circ \text{C}$ .

Die hohen Verzögerungswerte (Abb. 17) lassen eindeutig den schädigenden Einfluß einer anschließenden Kältenachbehandlung erkennen. Die Verzögerungswerte sind durchschnittlich doppelt so hoch wie die Werte bei Eizellen, die bei  $20 \pm 5^\circ \text{C}$  bestrahlt wurden. Im Vergleich zu den Verzögerungswerten der bei  $4^\circ \text{C}$  bestrahlten Eizellen verhält sich der Größenunterschied sogar 1:4.

Bei den Untersuchungen von Cook (1939) und Evans (1950) über den Einfluß einer längeren Kältenachbehandlung auf die Erholung röntgenbe-strahlter *Parascaris*-Eizellen ist, wie der höhere Anteil an pathologischen Embryonen bewies, eine teilweise Erholung eingetreten.

Bringt man *Parascaris*-Eizellen, die mit dem UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$  (Dosis = 3000 erg) bestrahlt wurden, für längere Zeit (12 Wochen) in eine Temperatur von etwa  $4^\circ \text{C}$  und anschließend in optimalen



Abb. 18. Pathologischer Embryo. Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ . Dosis = 3000 erg/mm<sup>2</sup>.

Lebensbedingungen ( $50^\circ \text{C}$  und ausreichende Versorgung mit Frischluft) zur Entwicklung, dann bilden diese Zellen neben vereinzelten pathologischen Embryonen (Abb. 18, 19 und 20)

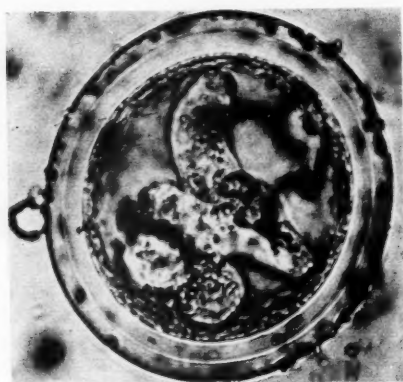


Abb. 19. Pathologischer Embryo. Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ . Dosis = 3000 erg/mm<sup>2</sup>.

nur unregelmäßige Zellhaufen aus. In keiner der untersuchten Serien konnten Anzeichen ermittelt werden, die auf eine teilweise Erholung der bestrahlten Zellen vom Strahlenschaden hingewiesen hätten. Offenbar sind die Veränderungen wichtiger Zellelemente durch das UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$  bedeutend größer als die Veränderungen, die durch die Röntgenstrahlen verursacht wurden.

Da es sich bei den Ascariden um fakultative Anaerobionten handelt, lag es nahe, die Wirkung einer sauerstofffreien Stickstoffatmosphäre auf die Erholung UV-bestrahlter Eizellen zu untersuchen.

Die Eier wurden stündlich nach der Kühlshrankentnahme bestrahlt und anschließend in einem Exsikkator, der mit Stickstoff gefüllt war, maximal 48 Stunden aufbewahrt.



Der geringe Sauerstoffanteil, der im handelsüblichen Stickstoff noch vorhanden ist, konnte mit Hilfe einer konzentrierten Pyrogallollösung, durch die der Stickstoff geleitet wurde, entfernt werden. Der mit einem Stutzen für die Aufnahme eines doppelt durchbohrten Stopfens versehene Exsikator wurde mit den beschickten Bestrahlungsgefäßen gefüllt. Nachdem 15 Minuten lang Stickstoff eingeströmt, und man annehmen durfte, daß die Luft völlig aus dem Gefäß vertrieben war, wurden beide Ventile der Ein- und Auslaßrohre geschlossen.

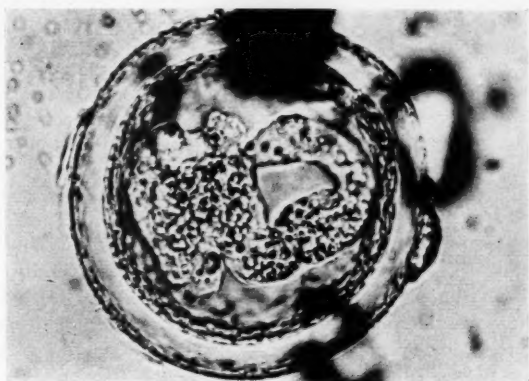


Abb. 20. Pathologischer Embryo. Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ . Dosis =  $3000 \text{ erg/mm}^2$ .

Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurden die Eizellen in optimalen Bedingungen ( $30^\circ \text{C}$  und ausreichende Versorgung mit Frischluft) zur Entwicklung gebracht.

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß die Abwesenheit von Sauerstoff nach der Bestrahlung keinen Einfluß auf die Strahlenerholung der *Parascaris*-Eizellen hat. Aus sämtlichen UV-bestrahlten Eiern gehen ausschließlich pathologische Keime hervor.

#### B. Der Einfluß von Stickstoff während der Bestrahlung auf die Erholung der Eizelle vom Strahlenschaden

Die beschriebenen Versuche zeigten, daß eine Stickstoffnachbehandlung die Strahlenerholung UV-bestrahlter *Parascaris*-Eizellen nicht fördert. Es wäre durchaus denkbar, daß die UV-Schäden bei Anwesenheit von Sauerstoff während der Bestrahlung durch oxydative Reaktionen in der Zelle fixiert werden, und dann durch den einsetzenden anaeroben Stoffwechsel nicht mehr zu beheben sind. Nun bleibt zu untersuchen, inwieweit sich durch einen Ersatz von Sauerstoff durch Stickstoff während der Bestrahlung Veränderungen in der Entwicklung der Zellen ergeben.

Für diese Versuche wurde eine Küvette verwandt, die eine Bodenplatte aus Quarz und einen luftdicht verschließbaren Schraubdeckel aufwies. Außerdem waren beiderseits zwei Rohrstutzen für den Anschluß der Gasschläuche angebracht.

Die *Parascaris*-Eier wurden in dieser Küvette bestrahlt, durch die 25 Minuten vor bis 5 Minuten nach einer jeweiligen Bestrahlung sauerstofffreier Stickstoff strömte. Als Kontrollen dienten zwei in Luft bestrahlte Versuchsserien. Die Weiterentwicklung der in Stickstoff bestrahlten *Parascaris*-Eizellen erfolgte in optimalen Bedingungen (50° C und ausreichende Versorgung mit Frischluft).

Die Versuchsergebnisse zeigen jetzt eine teilweise Erholung der Eizellen vom Strahlenschaden. 26% aller bestrahlten Eier einer Serie, das sind 2400 Zellen, hatten nach acht Tagen normale Embryonen entwickelt, die sich recht lebhaft bewegten.

Unterschiede in der Teilungsverzögerung zwischen den in Stickstoff und den in Luft bestrahlten Eizellen traten nicht auf.

### C. Untersuchungen über den Einfluß von UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ und einer Dosis von 3000 erg/mm<sup>2</sup> auf die Viskosität des Cytoplasma

Auf Grund der Ergebnisse der vorangegangenen Abschnitte könnte durchaus ein Einfluß dieser Strahlung auf die Viskosität des Cytoplasma vorliegen. Mit Hilfe der Zentrifugierung und der Granulabewegung (RVM) sollen die Viskositätsveränderungen des Plasma bestrahlter Eizellen vom Zeitpunkt der Bestrahlung bis zum Teilungsbeginn und während der Teilung ermittelt werden.

Die dem Kühlschrank entnommenen Eizellen wurden in eine Glasschale überführt und in einschichtiger Lage bestrahlt. Bis zum Teilungsbeginn wurde stündlich eine gleiche Eianzahl entnommen, in die Zentrifuge gebracht und so lange zentrifugiert, bis alle 1  $\mu$  großen Granulen in eine Eihemisphäre verlagert waren. Die Zeitdauer (Minuten), die zu einer Verlagerung der Granulen in der Zelle aufgewandt werden muß, kann als relativer Wert der intrazellulären Viskosität angesehen werden; denn je geringer die Viskosität des Plasma, desto rascher erfolgt eine Verlagerung der Granulen.

In Abb. 21 ist die Viskositätsänderung bis zum Teilungsbeginn in unbestrahlten Eizellen dargestellt; Abb. 22 und 23 veranschaulichen den Verlauf der Viskosität in Eiern, die eine Dosis von 1500 und 3000 erg/mm<sup>2</sup> eingestrahlt erhielten. Auf der Ordinate ist die Zentrifugierungsdauer in Minuten, auf der Abszisse der jeweilige Zeitpunkt der Zentrifugierung in Stunden nach erfolgter Bestrahlung eingetragen. Sämtliche Versuche wurden bei  $22 \pm 1^\circ \text{C}$  ausgeführt.

In Abb. 21 (Kurve 1 und 2) setzt sofort bei Entwicklungsbeginn der Eizellen eine stetige Verringerung der Viskosität ein, die allmählich einem Minimum zustrebt; nach 12 Stunden Teilungsvorbereitung hat die Viskosität des Cytoplasma ihren niedrigsten Wert erreicht. Die Untersuchung der Viskosität in Eizellen, denen eine Dosis von 1500 erg/mm<sup>2</sup> eingestrahlt wurde (Abb. 22), bringt, abgesehen von kleinen Unterschieden, einen der Abb. 21 ähnlichen Verlauf der ermittelten Werte für die Viskosität; eine Bestrah-

lungsdosis von  $1500 \text{ erg/mm}^2$  vermag die Viskosität des Plasma nur unwesentlich zu beeinflussen.

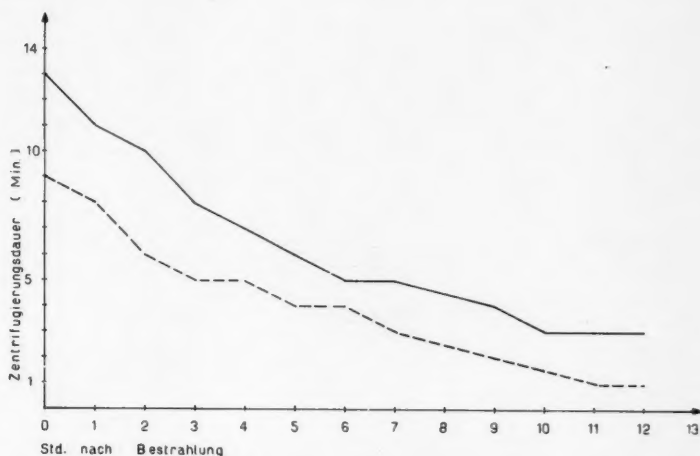


Abb. 21. Die Änderung der Viskosität in unbestrahlten *Parascaris*-Eizellen bis zur ersten Teilung. Kurve --- Uterus 1, Kurve — Uterus 2.

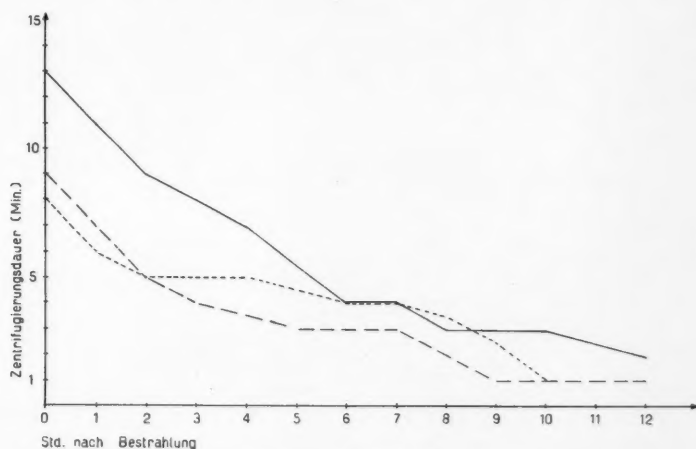


Abb. 22. Die Änderung der Viskosität in UV-bestrahlten *Parascaris*-Eizellen bis zur ersten Teilung. Dosis =  $1500 \text{ erg/mm}^2$ , Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ . Kurve --- Uterus 1, Kurve — — — Uterus 2 und Kurve — Uterus 3.

Demgegenüber zeigt die Dosis von  $3000 \text{ erg/mm}^2$  eine deutliche Wirkung auf die Viskosität des Cytoplasma bestrahlter Eizellen (Abb. 23).

Auf eine anfängliche Viskositätsabnahme folgt bei Kurve — — — nach drei Stunden, bei Kurve — — — — nach vier Stunden und bei Kurve — — — — — nach fünf Stunden eine konstante Viskosität, die sich bis neun Stunden

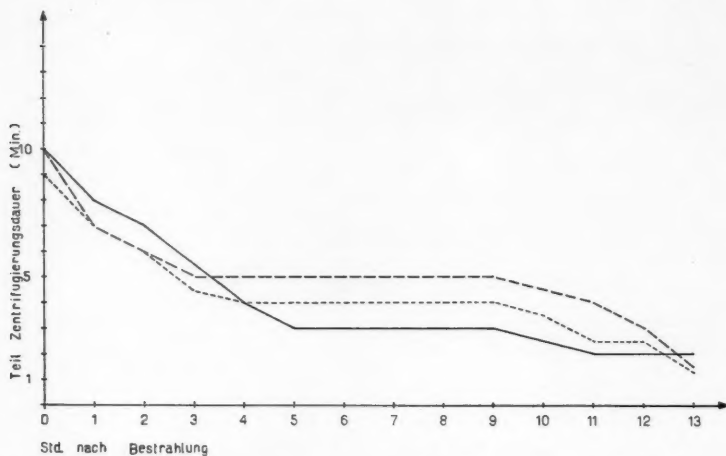


Abb. 23. Die Änderung der Viskosität in UV-bestrahlten *Parascaris*-Eizellen bis zur ersten Teilung. Dosis = 5000 erg/mm<sup>2</sup>. Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ . Kurve — — — — — Uterus 1, Kurve — — — — Uterus 2, Kurve — — — — Uterus 3.

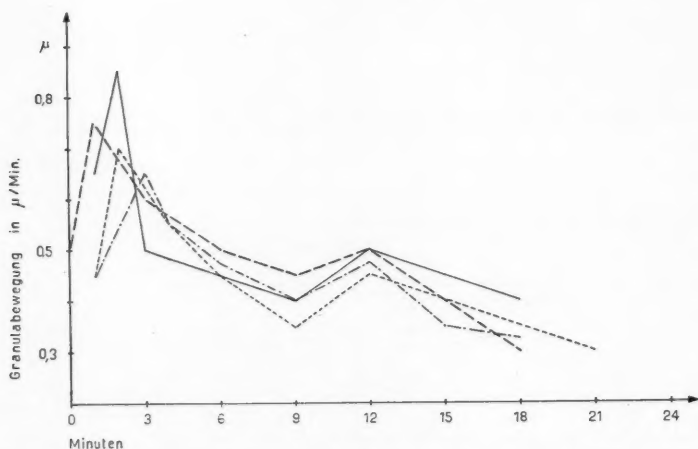


Abb. 24. Die Granulabewegung (RVM) UV-bestrahlter *Parascaris*-Eizellen während der Teilung. Dosis = 5000 erg/mm<sup>2</sup>, Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ , — — — — 10 Stunden nach Kühlschrankentnahme, — — — — 5 Stunden nach Kühlschrankentnahme, — — — — 0 Stunden nach Kühlschrankentnahme, — — — — unbestrahlte Eizellen.

nach Entwicklungsbeginn der Eizellen erstreckt. Von diesem Zeitpunkt ab setzt eine erneute Abnahme der Viskosität bis zum Teilungsbeginn der Eier ein.

Die Untersuchung der Viskosität während der Zellteilung mit Hilfe der Änderung der Granulabewegung (RVM) in Eizellen, die in drei Phasen unterschiedlicher Empfindlichkeit bestrahlt wurden (Abb. 24), läßt eine Wirkung der eingestrahnten Dosis vermissen.

Auf der Ordinate dieser Darstellung ist die Granulabewegung in Mikron, auf der Abszisse die diesen Werten zugeordnete Zeit in Minuten nach Teilungsbeginn abgetragen.

Sämtliche Kurven beginnen mit einem Anstieg der Intensität der Granulabewegung (RVM), dem sich ein starker Abfall der Intensität anschließt, der wieder von einem Anstieg der Granulabewegung (RVM) in der 9. bis 12. Minute nach Teilungsbeginn abgelöst wird. Nach diesem zweiten Maximum beobachtet man einen erneuten Abfall der Bewegungsintensität bis zur völligen Durchschnürung der Eizelle. Für die Viskositätszustände in der Eizelle bedeutet eine Zunahme der Intensität der Granulabewegung (RVM) eine Verringerung, und eine Abnahme der Intensität der Granulabewegung (RVM) eine Erhöhung der Viskosität.

Die in Abb. 24 aufgetretenen Unterschiede der eingezeichneten Kurven sind nicht einer Strahlenwirkung, sondern ausschließlich der „Individualität“, d. h. der individuellen Verschiedenheit der zelleigenen Viskosität zuzuschreiben. Die Kurven der Abb. 21, 22 und 23 bieten hierfür die besten Beispiele, nur mit der Ausnahme, daß es sich hier um die Gesamtzahl der in einem Uterus vorhandenen und nicht um einzelne Eizellen handelt.

#### D. Die Wirkung des UV-Lichtes der Brenner HQA 500 und HNS 12

##### 1. Die Wirkung des UV-Lichtes der Brenner HQA 500 und HNS 12 auf die Viskosität während der Zellteilung

Die Eiweißbestrahlung mit UV-Licht führt zu Schädigungen, die sich durch Veränderungen der Viskosität bemerkbar machen. Ausgelöst werden diese Veränderungen 1. durch eine photochemische Reaktion, die in einer Veränderung der Verknüpfung und Zuordnung der Polypeptidketten besteht, 2. durch die Überführung des bestrahlten Eiweißes in die Koagulationsreife und schließlich 3. durch die Koagulation selbst.

Die Analyse der Granulabewegung (RVM) in *Parascaris*-Eizellen, die während der Teilung bestrahlt und unter Zeitraffung aufgenommen wurden, soll einen quantitativen Vergleich der Wirkungen einzelner UV-Spektralbereiche und des UV-Lichtes der Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$  auf die Viskosität des Cytoplasma ermöglichen.

In Abb. 25 ist die Granulabewegung (RVM) in Eizellen eingezeichnet, die 7 Tage nach der Uterusentnahme mit UV-Licht verschiedener  $\lambda$ -Bereiche (Bäckström und WG 6, Bäckström und WG 7 und nur das Bäckströmfilter) des HQA-Brenners bestrahlt wurden. Auf der Ordinate ist wieder die

Granulabewegung in Mikron, auf der Abszisse, die diesen  $\mu$ -Werten zugeordnete Zeit in Minuten nach Teilungsbeginn abgetragen.

Sofort nach Teilungsbeginn sinkt die Plasmaviskosität ab, charakterisiert durch den Anstieg der Intensität der Granulabewegung. Auf diesen Anstieg folgt dann ein Abfall der Bewegungsintensität, der nach einer kurzfristigen Unterbrechung in der 12. Minute nach Teilungsbeginn sein Minimum erreicht hat; während dieses Teilungsstadiums ist die Viskosität am größten. Nach diesem Minimum kommt es zu einem zweiten Maximum der Bewegungs-Intensität in der 14. und 15. Minute nach Teilungsbeginn.

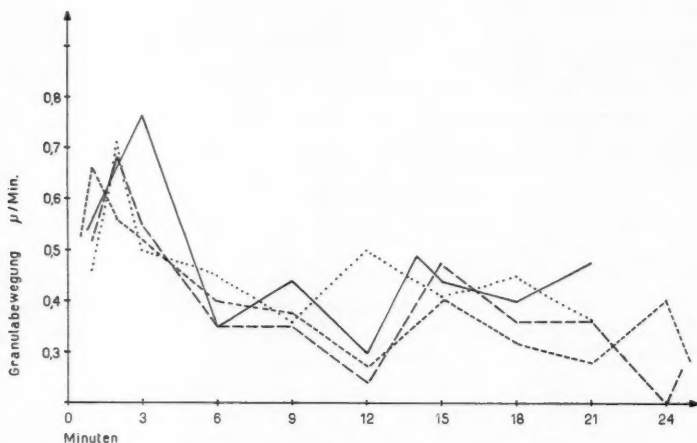


Abb. 25. Die Granulabewegung (RVM) in *Parascaris*-Eizellen, die während der Teilung bestrahlt wurden. — Bäckström und WG 6, ---- Bäckström und WG 7, — — — nur Bäckström-Filter, .... unbeirradierte Eizellen.

Dosis =  $5,8 \times 10^6$  erg/cm<sup>2</sup>. Eier 7 Tage nach Uterusentnahme.

lungsbeginn, dem sich dann bis zur völligen Durchschnürung der Eizelle in der 21. bzw. 24. Minute eine Viskositätszunahme anschließt. Die kaum nennenswerten Unterschiede des UV-Lichtes der eingestrahnten Spektralbereiche lassen vermuten, daß „junge“ Zellen (wobei unter dem „Zellalter“ die Dauer der Külschrankaufbewahrung der Uteri verstanden werden soll) durch UV-Licht dieser  $\lambda$ -Bereiche (gleiche Dosis) nahezu unbeeinflussbar sind.

Anders verhalten sich *Parascaris*-Eier 30 Tage nach der Uterusentnahme (Abb. 26). Hier kommt es nur in Eizellen, die mit UV-Licht der Filterkombination Bäckström und WG 6 bestrahlt wurden, in der 3. Minute nach Teilungsbeginn zu einem Intensitäts-Maximum der Granulabewegung (RVM); es liegt um einen durchschnittlichen Wert von  $0,25 \mu$  höher, als die Maxima der beiden folgenden Kurven. Ebenso kommt es in der 15. Minute nach Teilungsbeginn nur in Kurve (—) zu einem ausgeprägten zweiten Maximum der Granulabewegung (RVM). Die Werte für die Granulabewegung



in Eizellen, die mit dem von der Filterkombination Bäckström und WG 7 und vom Bäckström-Filter allein hindurchgelassenen UV-Licht bestrahlt

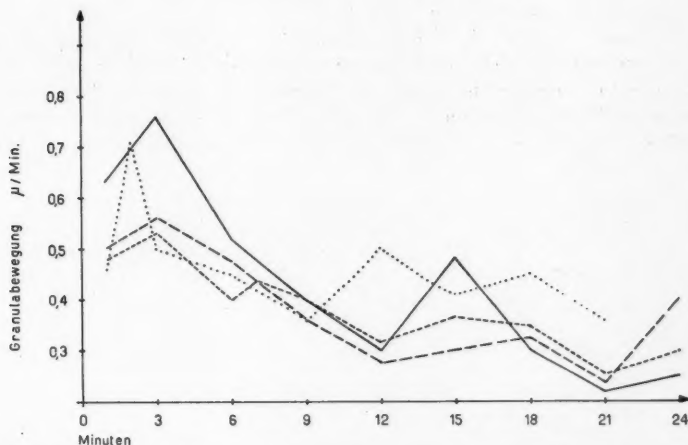


Abb. 26. Die Granulabewegung (RMV) in *Parascaris*-Eizellen, die während der Teilung bestrahlt wurden. — Bäckström und WG 6, --- Bäckström und WG 7, -.- nur Bäckström-Filter, .... unbestrahlte Eizellen. Dosis =  $5,8 \times 10^6$  erg/cm<sup>2</sup>. Eier 30 Tage nach Uterusentnahme.

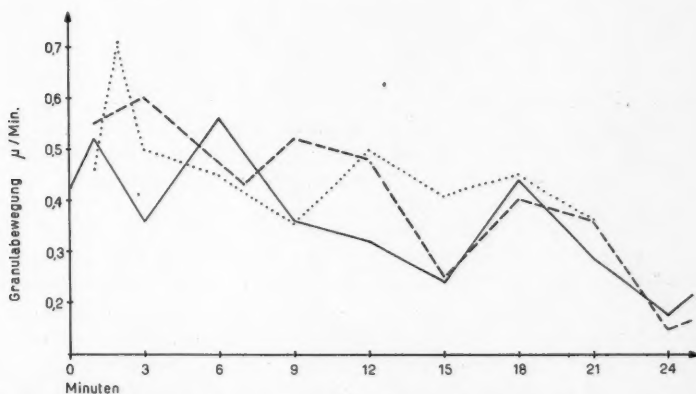


Abb. 27. Die Granulabewegung (RVM) in *Parascaris*-Eizellen, die während der Teilung mit dem UV-Lichte der Wellenlänge  $\lambda = 253,7$  m $\mu$  bestrahlt wurden — und --- bestrahlte Eizellen, .... unbestrahlte Eizellen. Dosis =  $5 \times 10^5$  erg/cm<sup>2</sup>. Eier 7 Tage nach Uterusentnahme.

wurden, liegen relativ dicht beieinander und lassen so auf die gleiche Wirkung beider UV-Spektralbereiche auf das Cytoplasma schließen.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen außer dem Unterschied der Strahlenwirkung verschiedener  $\lambda$ -Bereiche auf das Plasma „junger“ und „älterer“ Eizellen eine Erhöhung der Schädigung mit zunehmendem Anteil an kurzwelliger Strahlung.

Die vom „Zellalter“ abhängige UV-Strahlenwirkung auf das Cytoplasma ist noch eindrucksvoller in den Abb. 27 und 28 zu erkennen. Ein nahezu wellenförmiger Verlauf (Abb. 27) zeichnet die Granulabewegung (RVM) in Eizellen aus, die sieben Tage im Kühlschrank aufbewahrt wurden. Der dreimalige Wechsel von Maximum und Minimum der Inten-

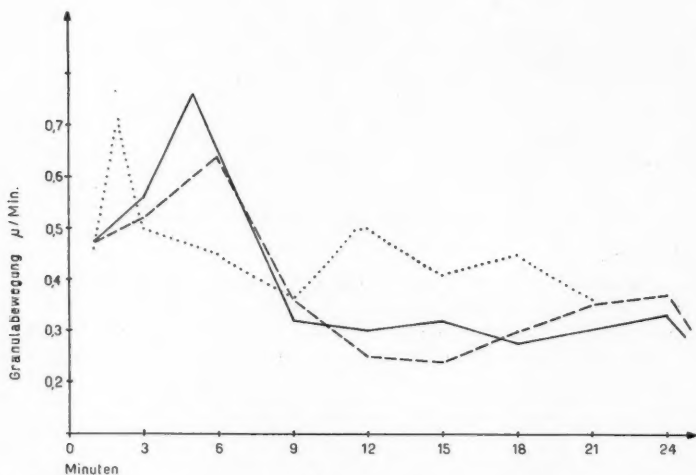


Abb. 28. Die Granulabewegung in *Parascaris*-Eizellen, die während der Teilung mit dem UV-Lichte der Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$  bestrahlt wurden, — und --- bestrahlte Eizellen, .... unbestrahlte Eizellen. Dosis =  $5 \times 10^6 \text{ erg/cm}^2$ . Eier 30 Tage nach Uterusentnahme.

sität der Granulabewegung deutet auf eine rhythmische Veränderung der Plasmaviskosität durch die UV-Strahlung hin.

Andersartig ist die Wirkung der UV-Strahlung des gleichen Brenners auf das Cytoplasma von *Parascaris*-Eizellen die 30 Tage im Kühlschrank aufbewahrt wurden (Abb. 28). Nach Teilungsbeginn kommt es zu einem langsamen Ansteigen der Intensität der Granulabewegung (Abnahme der Viskosität), die ihr erstes Maximum in der 5. und 6. Minute nach Teilungsbeginn erreicht. Dieser Viskositätserniedrigung (erhöhte Intensität der Granulabewegung) schließt sich zuerst ein stetiger Abfall der Intensität an, der in der 9. Minute von einem fast gleichbleibendem Verlauf der RVM-Werte abgelöst wird. Die Parallelität der RVM-Werte zur Abszisse läßt auf eine konstante Viskosität in der Zelle bis zur völligen Durchschnürung schließen; die kleinen Abweichungen der Kurve (---) können vielleicht vernachlässigt werden.

## 2. Die Wirkung des UV-Lichtes der Brenner HQA 500 und HNS 12 auf den Ablauf des Durchschnürungsvorganges

An die Ergebnisse über den Einfluß von UV-Licht auf die Viskosität sich teilender Eizellen verschiedenen „Alters“ anknüpfend, soll nun eine Analyse der Bildung der Teilungsfurche folgen. Harmonisch aufeinander abgestimmte physikalische und chemische Reaktionen bewirken einen Vorgang, dessen restlose Aufklärung bis heute noch nicht erreicht wurde. Es wird angenommen, daß die Durchschnürung durch ähnliche Re-

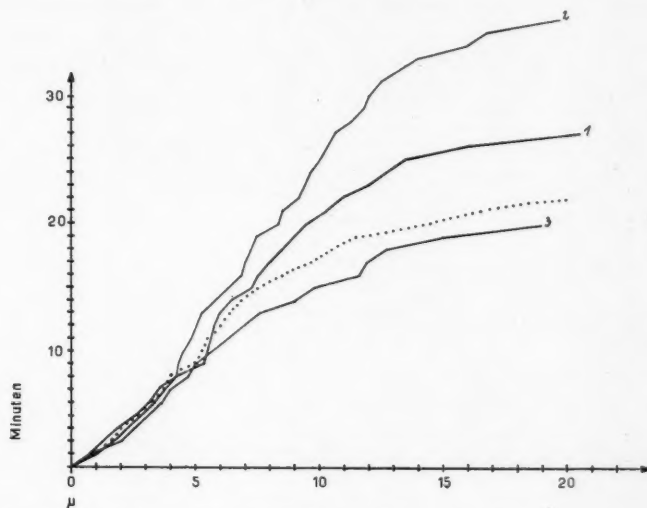


Abb. 29. Der Teilungsverlauf UV-bestrahlter *Parascaris*-Eizellen 7 Tage nach Uterusentnahme. Kurve ..... unbestrahlte Eizellen. Dosis =  $5,8 \times 10^8$  erg/cm<sup>2</sup>. Abszisse: Von der Furche zurückgelegte Wegstrecke. Ordinate: Zeitdauer der Teilung.

aktionen ausgelöst wird wie die Muskelkontraktion, bei der besonders ATP und gewisse Mg<sup>++</sup> eine wichtige Rolle spielen.

Immerhin wäre es interessant zu wissen, ob und inwieweit eine Veränderung der Viskosität diese Vorgänge zu beeinflussen vermögen.

Die Mitteilung der Ergebnisse der Viskositätsuntersuchungen röntgenbestrahlter Eizellen erfolgt erst im Anschluß an die Untersuchungen mit UV. Trotzdem sollen die Wirkungen verschiedener Dosen von Röntgenstrahlen auf den Durchschnürungsverlauf der Eizelle bereits hier besprochen werden.

Mit Hilfe der Teilbildanalyse ist es möglich, den Durchschnürungsverlauf bestrahlter Zellen zu verfolgen. Man zeichnet von Minute zu Minute je ein Teilbild des Filmstreifens auf Transparentpapier und projiziert die Endpunkte des Furchengrundes auf eine

gemeinsame Achse (Lamina 1958). Die in den einzelnen Minuten von der Furche zurückgelegten Wegstrecken können auf diese Weise genau gemessen und den betreffenden Zeitintervallen zugeordnet werden. Der Endpunkt jeder Kurve gibt gleichzeitig den Zeitpunkt der völligen Durchschnürung der Zelle an.

In den Abbildungen 29, 30, 31 und 32 ist auf der Ordinate die Zeitdauer der Teilung, auf der Abszisse die in diesen Zeitabständen von der Teilungsfurche zurückgelegte Wegstrecke in Mikron abgetragen.

In Abb. 29 werden von der Furche der mit dem UV-Licht der  $\lambda$ -Bereiche Bäckström und WG 6, Bäckström und WG 7 und nur das Bäckström-Filter

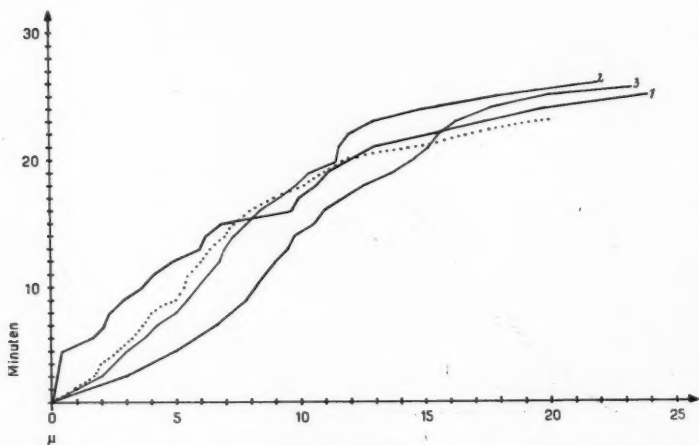


Abb. 30. Der Teilungsverlauf UV-bestrahlter *Parascaris*-Eizellen 30 Tage nach Uterusentnahme. Kurve .... unbestrahlte Eizellen. Dosis =  $5,8 \times 10^6$  erg/cm<sup>2</sup>. Abszisse: Von der Furche zurückgelegte Wegstrecke. Ordinate: Zeitdauer der Teilung.

bestrahlten „jüngeren“ Eizellen in den ersten acht Minuten gleiche Wegstrecken zurückgelegt. Die von der achten Minute an auftretenden Unterschiede sind nicht auf eine Strahlenwirkung, sondern lediglich auf die verschiedenen Eidurchmesser zurückzuführen.

Von einem Einfluß der durch die UV-Strahlung veränderten Viskosität des Plasma in „älteren“ Eizellen (Abb. 26) kann auch in Abb. 30 nicht gesprochen werden. Die in Kurve 1 der Abb. 30 ersichtliche Verzögerung des Vordringens der Teilungsfurche wird durch das „Nachhinken“ einer Eiseite während der Teilung bedingt. Nach 5 Minuten ist der Teilungsvorgang dieser „nachhinkenden“ Eiseite so weit fortgeschritten, daß von diesem Zeitpunkt an vom Furchengrund gleiche Wegstrecken in der Zeiteinheit zurückgelegt werden.

Auch in Eizellen (Abb. 31) 7 und 30 Tage nach Uterusentnahme, die mit UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 253,7$  m $\mu$  bestrahlt wurden, ist kein Einfluß

der Viskosität auf den Furchungsverlauf festzustellen. Die Teilungskurven weichen in ihrer Form nicht von der unbestrahlter Eizellen (Kurve . . .) ab.

Da bei den besprochenen Versuchen nur konstante UV-Dosen angewandt wurden, kann über die Wirkung verschieden hoher Dosen auf die Furchung der Eizelle noch nichts ausgesagt werden.

Um eine Klärung dieser Zusammenhänge zu erreichen, wurde die Furchenbildung röntgenbestrahlter *Parascaris*-Eier mikrokine-matographisch verfolgt und die Ergebnisse dieser Untersuchungen in Abb. 32 eingezeichnet.

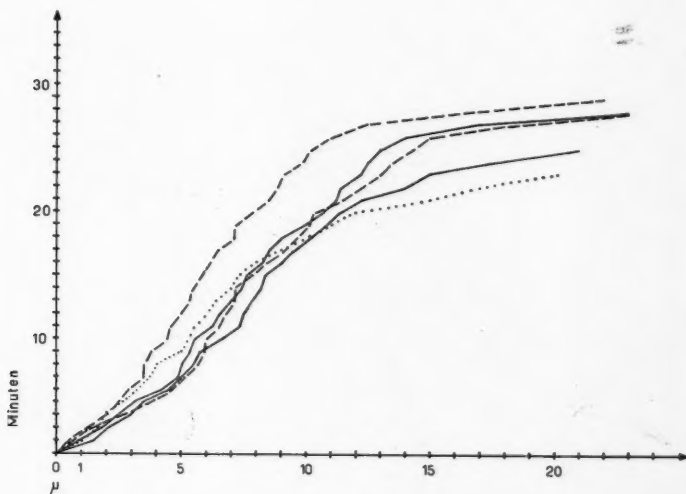


Abb. 31. Der Teilungsverlauf UV-bestrahlter *Parascaris*-Eizellen 7 und 30 Tage nach Uterusentnahme. Kurven — 7 Tage, Kurven - - - 30 Tage alte Eier, Kurve . . . unbestrahlte Eizellen, Dosis =  $5 \times 10^5$  erg/cm<sup>2</sup>. Wellenlänge  $\lambda = 253,7$  m $\mu$ . Abszisse: Von der Furche zurückgelegte Wegstrecke. Ordinate: Zeitdauer der Teilung.

Der Teilungskurvenverlauf ist, von den kleinen individuellen Unterschieden abgesehen, mit der Teilungskurve unbestrahlter Eizellen identisch. Bestrahlungsdosen, die nur eine geringe (Kurve —), und Dosen, die eine große Viskositätsänderung verursachen (Kurve - - -), sind wirkungsgleich. Für die Dosis von 8 kr ist dies nicht weiter wunderlich, denn eine geringe Viskositätsänderung wird sich für den Furchungsverlauf nicht als hindernd erweisen. Um so erstaunlicher ist es, daß eine Dosis von 48 kr, die einen großen Einfluß auf die Viskosität des Plasma der Zelle auszuüben vermag (Abb. 35), den Vorgang der Furchenbildung nicht beeinflusst. Die kontraktionsfähige Zone erwies sich strahlenresistenter als man annehmen konnte.

### 3. Die Absorption des UV-Lichtes der Hg-Brenner HQA 500 und HNS 12 durch das *Parascaris*-Ei

In den vorausgegangenen Abschnitten wurden die Reaktionen der UV-Strahlen der beiden Hg-Brenner auf das Cytoplasma der *Parascaris*-Eizelle aufgezeigt und miteinander verglichen. Von besonderem Interesse ist es nun, die Absorption des Gesamtlichtes der beiden Brenner durch die Eizelle zu messen, um festzustellen, ob die quantitativen Unterschiede der Strahlenwirkung auf das Cytoplasma der Zelle etwa absorptionsbedingt sind.

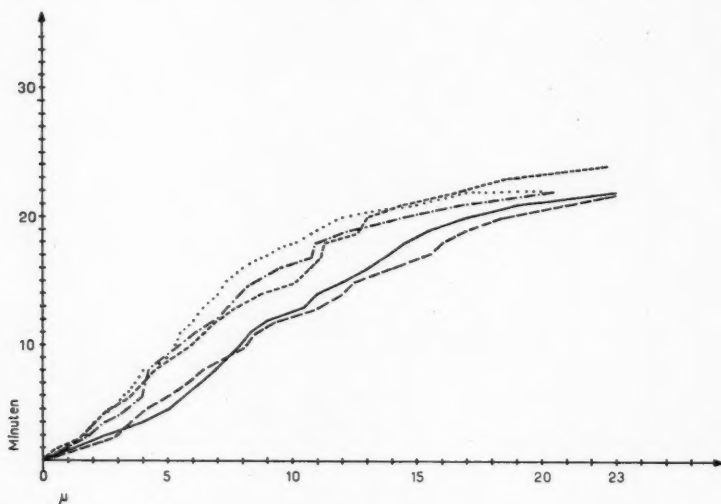


Abb. 32. Der Teilungsverlauf röntgenbestrahlter *Parascaris*-Eizellen. Kurve — 8 kr, Kurve — — 16 kr, Kurve — · — 32 kr, Kurve — — — 48 kr, Kurve .... unbestrahlte Eizellen. Abszisse: Von der Furche zurückgelegte Wegstrecke. Ordinate: Zeitdauer der Teilung.

Zur Absorptionsmessung fand folgende Gleichung Verwendung (Giese 1938):

$$A = 1 - \frac{I_1}{I_0} \cdot \frac{1}{A_e}$$

In dieser Gleichung bedeutet  $I_0$  die Intensität des einfallenden und  $I_1$  die Intensität des durchfallenden Lichtes.

Die Zahl  $A_e$  läßt sich aus der im Experiment vorliegenden Anzahl der *Parascaris*-Eier, dividiert durch die größte Zahl der Eizellen, die in einschichtiger Lage den Boden des Meßgerätes bedecken können, ermitteln.

$I_0$  und  $I_1$  lassen sich mit einer Photozelle oder mit einer Thermosäule bestimmen.

Das benutzte Meßgefäß bestand aus einem Quarzobjektträger, dem ein Glasring mit einem Durchmesser von 16 mm mit Paraffin aufgeklebt war.

In diesen Ring paßte genau das Ende eines der kegelstumpfförmigen Reflektoren, so daß die bestrahlte Fläche auf den Ringdurchmesser begrenzt werden konnte. Da sämtliche Eizellen im optischen Schnitt eine elliptische Form aufweisen, wurden an hundert Eizellen beide Halbmesser gemessen und die absorbierende Fläche des Eies berechnet. Sie betrug im Durchschnitt  $6,2 \times 10^3 \mu^2$ . Der Flächeninhalt des Glasrings betrug  $201 \times 10^6 \mu^2$ . Ungefähr 32 500 Eizellen sind demnach erforderlich, um den Boden dieses Gefäßes in einschichtiger Lage zu bedecken.

In die Tabelle Abb. 33 sind die errechneten Werte für sechs Messungen eingetragen. Der Vergleich der beiden Mittelwerte  $\bar{A}$  zeigt eine um 0,34 stärkere Absorption der HNS-12- gegenüber der HQA-500-Strahlung.

Abb. 33. Die UV-Absorption von *Parascaris*-Eizellen bei der Bestrahlung mit den beiden Hg-Brennern HQA 500 und HNS 12.

Gesamtlicht des Hg-Hochdruckbrenners HQA 500							
Versuche	Eieranzahl	$I_0$	$I_1$	$1-I_1/I_0$	$1/A_e$	$1-I_1/I_0 \times 1/A_e$	$\bar{A}$ rel.
1	4366	61,30	52,20	0,15	7,1	1,07	1,18
2	4572	67,60	55,50	0,18	7,2	1,29	
3	5450	60,78	48,47	0,20	5,9	1,18	
Gesamtlicht des Hg-Niederdruckbrenners HNS 12							$\bar{A}$ rel.
1	5272	8,0	6,0	0,25	6,3	1,58	1,52
2	4164	8,0	6,4	0,20	7,7	1,54	
3	6290	8,0	5,8	0,27	5,3	1,43	

UV-Licht einer bestimmten Wellenlänge kann nur in Substanzen voll zur Wirkung kommen, von denen es maximal absorbiert wird. Von dieser Tatsache ausgehend, lassen sich nun auch die größeren Wirkungen der Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$  auf das Cytoplasma verstehen, deren Ursache in einer stärkeren Absorption dieser Wellenlänge in den Nukleoproteiden zu liegen scheint.

Das Spektrum des Hg-Hochdruckbrenners HQA 500, dessen cytologisch wirksamen Linien im UVC nur einen relativ kleinen Energieanteil aufweisen (Abb. 1), wird von der *Parascaris*-Eizelle im geringeren Maße absorbiert. Diese beiden genannten Faktoren sind dafür verantwortlich zu machen, daß trotz einer höheren Dosis ( $5,8 \times 10^6 \text{ erg/cm}^2$ ) eine kleinere Wirkung auf die Viskosität des Cytoplasma erzielt wurde.

## V. Die Wirkung von Röntgenstrahlen auf die Viskosität während der Teilung der *Parascaris*-Eizelle

Nach den Untersuchungen über die Wirkung von UV-Strahlen der Wellenlängen  $\lambda = 220\text{--}248 \text{ m}\mu$  auf Eiweißlösungen, Rajewsky (1929), ist es nicht ausgeschlossen, an Prädissoziationszustände der bestrahlten Moleküle zu denken. Ebenfalls ist eine Wirkung der durch die UV-Strahlen ausgelösten, langsamen Elektronen auf die bestrahlte Materie keineswegs zu



verneinen. Die energiereichen Röntgenstrahlen verursachen ausschließlich Ionisationen in den getroffenen Molekülen. Bestrahlt

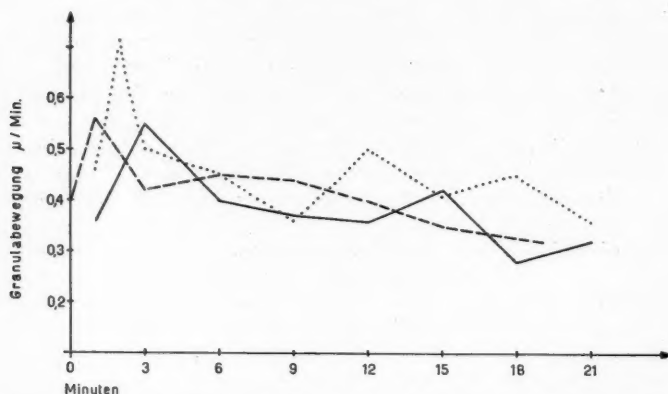


Abb. 34. Die Granulabewegung (RVM) in *Parascaris*-Eizellen während der Teilung, die mit verschiedenen Röntgendosen bestrahlt wurden. Kurve — 8 kr, Kurve --- 16 kr, Kurve .... unbestrahlte Eizellen.

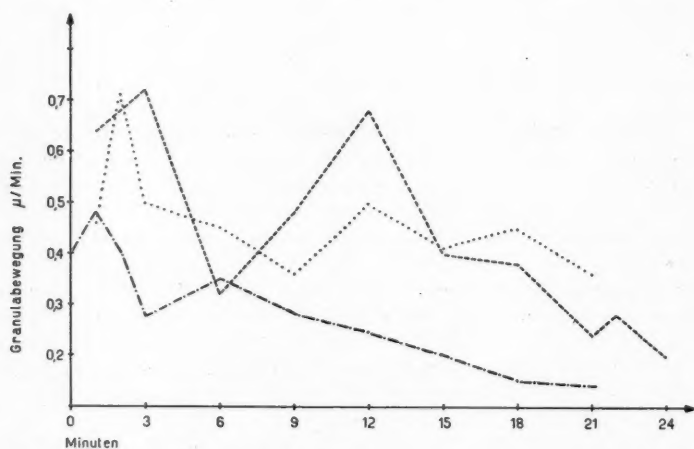


Abb. 35. Die Granulabewegung (RVM) in *Parascaris*-Eizellen während der Teilung, die mit verschiedenen Röntgendosen bestrahlt wurden. Kurve --- 32 kr, Kurve -.- 48 kr und Kurve .... unbestrahlte Eizellen. Ordinate: Granulabewegung in Mikron. Abszisse: Die diesen Mikron-Werten zugeordnete Zeit in Minuten nach Teilungsbeginn.

man eine Substanz mit einer Strahlung, deren Quantenenergie größer als die Bindungsenergie der Moleküle ist, so wirkt die Strahlung auf die Atome,

die diese Moleküle aufbauen. In den getroffenen Atomen werden Elektronen herausgeschlagen, die bei einem Zusammenstoß mit anderen Molekülen zu Dissoziationen, d. h. zu heterolytischer Spaltung führen können.

In den Abb. 34 und 35 sind die Wirkungen verschiedener Röntgendosen auf die Viskosität der *Parascaris*-Eizelle während der Teilung graphisch dargestellt.

Auf der Ordinate ist die Granulabewegung (RVM) in Mikron, auf der Abszisse die diesen Werten zugeordnete Zeit in Minuten nach Teilungsbeginn abgetragen.

Auf eine Viskositätserniedrigung (Abb. 34) röntgenbestrahlter Eizellen, Kurve — in der vierten und bei Kurve — in der ersten Minute nach Teilungsbeginn, folgt ein Anstieg der Viskosität, der nur in Kurve — von einer erneuten Abnahme der Viskosität in der 15. Minute nach Teilungsbeginn abgelöst wird. Dieses zweite Intensitätsmaximum der Granulabewegung tritt in Eizellen, die mit 16 kr bestrahlt wurden, nicht mehr auf.

Die Viskosität des Plasma röntgenbestrahlter *Parascaris* Eizellen steht scheinbar in einem direkten Zusammenhang mit der eingestrahnten Dosis.

Um so überraschender ist es, wenn plötzlich diese Proportionalität von der lebenden Zelle aufgehoben wird (Abb. 35). Das in der 3. Minute nach Teilungsbeginn auftretende Intensitätsmaximum (Kurve —) ist dem ersten Maximum unbestrahlter Eizellen gleich groß. Das zweite Maximum in der 12. Minute nach Teilungsbeginn ist sogar um  $0,18 \mu$  größer als das zweite Maximum der Granulabewegung in unbestrahlten Eizellen. Kurve —, 48 kr, zeigt wieder die Proportionalität der Viskosität des Cytoplasma zur eingestrahnten Dosis. Dem ersten Maximum der Granulabewegungs-Intensität folgt ein starker Abfall bis auf  $0,28 \mu/\text{min}$ . Dieser Abfall wird durch einen Anstieg der Intensität der Granulabewegung auf  $0,35 \mu/\text{min}$  in der 6. Minute nach Teilungsbeginn abgelöst, dem nun ein stetiger Abfall der Intensität der Granulabewegung (RVM) bis auf  $0,1 \mu/\text{min}$  folgt. Diese Intensitätsminderung ist einer fortschreitenden Viskositätszunahme des Cytoplasma identisch.

## VI. Theoretischer Teil

In dem nun folgenden Teil dieser Arbeit werden zuerst die Ergebnisse der UV-Bestrahlungen der Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$  besprochen, und daran die Wirkungen von UV-Licht der beiden Hg-Brenner HQA 500, HNS 12 und Röntgenstrahlen auf die Viskosität des Cytoplasma und den Teilungsverlauf der Zelle angeschlossen.

Bestrahlt man *Parascaris*-Eizellen zu verschiedenen Zeiten nach der Entnahme aus dem Kühlschrank mit dem UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ , dann wirkt sich die Bestrahlung der Eizellen unmittelbar nach Entnahme maximal auf die Teilungsverzögerung aus (Abb. 5, 6, 9, 10 und 11). Eizellen, die 8, 9, 10 und 11 Stunden nach Kühlschrankentnahme, also kurz vor Teilungsbeginn, bestrahlt wurden, zeigten keine Teilungsverzögerung.

Wie bereits erwähnt wurde, trat das Maximum der Teilungsverzögerung röntgen- und UV-bestrahlter *Arbacia*-Eier erst dann auf, wenn die Bestrahlung der Eizellen vor dem sichtbaren Einsetzen der Prophase

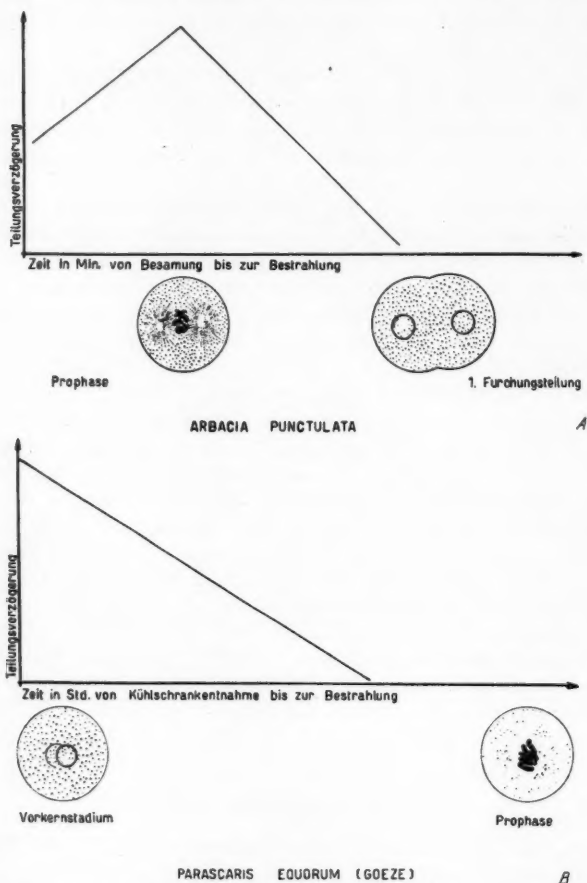


Abb. 36. Schema zum Vergleich der Relation zwischen Teilungsverzögerung und Mitosephasen bei *Arbacia punctulata* und *Parascaris equorum*. A: Röntgenbestrahlte *Arbacia*-Eizellen nach Henshaw und Cohen (1940). Verlauf der Teilungsverzögerung stark schematisiert. B: UV-bestrahlte ( $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ ) *Parascaris*-Eizellen. Der Verlauf der Teilungsverzögerung ist schematisiert.

erfolgte (Henshaw und Cohen 1940 und Blum und Price 1950). Die Bestrahlung der Zellen während der Annäherung der beiden Vorkerne, der Vorkernvereinigung und während der Mitosestadien Metaphase, Anaphase und Telophase bewirken nur eine geringe, wenn überhaupt eine Teilungs-

verzögerung. In Abb. 36 sind die Mitosephasen und die Teilungsverzögerung bei *Arbacia*- und *Parascaris*-Eizellen in einem Schema zusammengefaßt und einander gegenübergestellt.

Auf Grund der Tatsache, daß sich alle *Parascaris*-Eier zum Zeitpunkt ihrer Verwendung in der Vorkernphase befinden und der gesamte Ablauf der Mitose von der Annäherung bis zur Vereinigung der Vorkerne experimentell durch die UV-Strahlung beeinflussbar ist, ist eine durchaus ähnliche Reaktion, wie sie bei *Arbacia* auftrat, in der *Parascaris*-Eizelle zu erwarten. Die Versuchsergebnisse (Abb. 5, 6, 9, 10, 11 und 12) beweisen aber gerade das Gegenteil; analog zu den Ergebnissen bei *Arbacia* (Abb. 36) müßten die *Parascaris*-Eizellen, die vor der Teilung bestrahlt wurden, also zu Prophasebeginn, eine große Teilungsverzögerung aufweisen. Das Auftreten des Verzögerungs-Maximums (Abb. 36) bei Eizellen, die zu Anfang des untersuchten Intervalls, d. h. zu Beginn der Entwicklung bestrahlt wurden, wäre vielleicht durch die Annahme einer Störung intrazellulärer metabolischer Prozesse durch die UV-Strahlung zu erklären.

Fermente sind hochmolekulare Verbindungen, die aus einer prosthetischen Gruppe (Coferment) und einem kolloidalen Träger (Apoferment), der gleichzeitig dem Holoferment seine Spezifität verleiht, zusammengesetzt sind. Aus diesem Aufbau ergeben sich zwei Möglichkeiten der Wirkung einer kurzwelligen Strahlung:

1. Die Strahlung kann das Coferment beeinflussen, indem sie die Anregung oder die Aufspaltung der prosthetischen Gruppe bewirkt oder eine Veränderung der Bindungsverhältnisse zwischen Apo- und Coferment herbeiführt.
2. Die UV-Strahlung kann das Trägereiweiß chemisch oder physikalisch-chemisch verändern.

Wird der kolloidale Zustand des Trägers oder seine Zusammensetzung durch photochemische Reaktionen verändert (Cronheim 1937), so können Verbindungen entstehen, die ihrerseits das Ferment beeinflussen. Schließlich bleibt noch die Einwirkung der Strahlung auf das Substrat zu berücksichtigen.

Torriani (1936) konnte bei ihren Untersuchungen über die Penicillinase-Synthese bei *Bacillus cereus*, die durch das Antibiotikum Penicillin induziert wird, feststellen, daß UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \mu$  die Synthese dieses Fermentes hemmt.

Auch in UV-bestrahlten Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* kommt es gleichfalls zu einer Unterdrückung der Catalase-Synthese, Bećarević (1957). Von Interesse ist, daß eine Wiederherstellung der Synthese erreicht wird, wenn den bestrahlten Zellen ein Extrakt aus unbestrahlten zugesetzt wird.

Torriani (1936) konnte außerdem nachweisen, daß die Empfindlichkeit des gesamten Systems der UV-Strahlung zeitabhängig ist; während der Induktion ist sie sehr beträchtlich; sie sinkt jedoch nach zwanzig Minuten stark ab. Es wird vermutet, daß die Strahlung zwar die Bildung

enzymbildender Zentren verhindert, jedoch die zum Zeitpunkt der Bestrahlung bereits vorhandenen nicht inaktivieren kann.

Auch bei *Parascaris* erweist sich die Wirkung der Strahlung auf Eizellen, die unmittelbar nach der Kühltrennung bestrahlt wurden (Abb. 9, 10 und 11), am größten. Bei der Aufbewahrungstemperatur von 4° C befindet sich die Zelle in einem Ruhezustand, einer Kältestarre; die Metaboliten-Aktivität ist nahezu Null. Wird nun die Eizelle in geeignete Lebensbedingungen (22–30° C und ausreichende Versorgung mit frischer Luft) gebracht, dann setzt sofort der Entwicklungsvorgang ein und gleichzeitig damit werden sämtliche metabolischen Prozesse wieder in Gang gesetzt.

Wie aus den Versuchen ersichtlich ist, sind die Metaboliten gegenüber der UV-Strahlung zu diesem Zeitpunkt (0-Stunden nach Kühltrennung) am empfindlichsten. Je kleiner aber die Zeitabstände von der Bestrahlung bis zur ersten Teilung werden, desto schwächer wird scheinbar die Wirkung der UV-Strahlung auf die *Parascaris*-Eizelle. Aus den Versuchsergebnissen (Abb. 5, 6, 9, 10, 11 und 12) geht deutlich hervor, daß das *Parascaris*-Ei nach einer bestimmten Entwicklungsphase durch UV nicht mehr beeinflusst wird. Das besagt also, daß die Eizelle jetzt bereits die notwendigen Baustoffe synthetisiert hat, die ihr eine unverzögerte Teilung ermöglichen, bevor das Synthesystem selbst durch eine UV-Inaktivierung unbrauchbar wird.

Die Mehrzahl der höheren organischen Verbindungen sind aus einzelnen „Teilstücken“ (Vor-, Zwischen- und Endstufen) zusammengesetzt, die durch Syntheseschritte gebildet und aneinandergefügt werden. In der lebenden Zelle werden diese einzelnen Schritte jeweils von einem Metaboliten und dieser wiederum von einem bestimmten Gen gesteuert. Durch die sinnvolle Koordination der Metaboliten entstehen wichtige Verbindungen für die Zelle, die einen normalen Ablauf der gesamten intrazellulären Funktionen gewährleisten. Wird eine Zelle mit UV bestrahlt, dann kann eine Schädigung der Metaboliten in bezug auf ihre Stellung in der Synthesekette an beliebig vielen Stellen erfolgen. Ohne weiteres wird eine Schädigung der Metaboliten, die für die Überführung der bereits gebildeten Stufen in die Endstufe verantwortlich sind, von der Zelle durch die Errichtung eines neuen Syntheseweges behoben werden können. Die Inaktivierung von Metaboliten, die Vor- und Zwischenstufen aufbauen oder weiterverarbeiten, kann von der Zelle durch eine derartige Umgehung womöglich nicht mehr ausgeglichen werden. Die nun einsetzende Reorganisation verursacht eine Entwicklungsverlangsamung, die sich als Teilungsverzögerung auswirkt. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist nach 6 Stunden die Bildung der für die Teilung der Zelle notwendigen Substanzen abgeschlossen, so daß eine UV-Bestrahlung nach diesem Zeitpunkt scheinbar keine Wirkung auf die Teilung mehr auszuüben vermag. Daß eine Schädigung der Metaboliten auch in der scheinbar „unempfindlichen“ Phase stattfindet, beweist die Teilung dieser Zellen in das T-Stadium, die größenordnungsmäßig etwa der Teilungsverzögerung der Eizelle in das Zweizellenstadium entspricht.

Der Zusammenhang der Strahlenwirkung beim *Parascaris*-

Ei mit metabolischen Prozessen wird in den Abb. 16 und 17 noch einmal recht deutlich.

Abbildung 16 zeigt Eizellen, die vor der jeweiligen Bestrahlung auf  $+4^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und dann erst bestrahlt wurden. Ein Temperaturunterschied von ungefähr  $+16^{\circ}\text{C}$  genügt, um die Wirkung der UV-Strahlung auf die Hälfte zu reduzieren; vergleiche Abb. 9, 10, 11 mit 16. Die Ergebnisse dieser Versuche deuten auf eine Schutzwirkung niedriger Temperaturen auf die Metaboliten hin.

Setlow und Doyle (1953), die Trypsin, Chymotrypsin und das Ferment Invertase mit UV der Wellenlänge  $\lambda = 253,7\text{ m}\mu$  bei  $90^{\circ}\text{K}$  und bei  $22^{\circ}\text{C}$  bestrahlten, fanden, daß bei tiefer Temperatur die Fermentaktivität weit geringer beeinflusst wird als bei  $22^{\circ}\text{C}$ .

Das Auftreten ähnlicher Effekte in der *Parascaris*-Eizelle kann nur vermutet werden, da bei allen Erklärungen die Strahlenwirkungen auf das Substrat und die Begleitstoffe (Elektrolyte und Nichtelektrolyte), die zweifellos eine Rolle im gesamten Reaktionsablauf in der Zelle spielen, unberücksichtigt blieben.

Die verstärkte Wirkung einer Kältenachbehandlung (Abb. 17) auf die Teilungsverzögerung UV-bestrahlter *Parascaris*-Eizellen ließe sich vielleicht folgendermaßen erklären.

Wie die Ergebnisse der Absorptionsmessungen (Abb. 33) für die Wellenlänge  $\lambda = 253,7\text{ m}\mu$  zeigen, wird diese Strahlung vornehmlich das Apoferment durch die Denaturierung des Eiweißes schädigen. Nach Scheibe (1947) besteht die Denaturierung in einer Veränderung der Feinstruktur durch die Störung der Zuordnung und Verknüpfung der über Wasserstoff-Brücken verbundenen Aminosäuren. Mit anderen Worten, die zugeführte Energie ( $E = h\nu$ ) wird in die Schwingungsfreiheitsgrade der Moleküle eingebaut. Wenn man sich nun vorstellt, daß auf Grund des sterischen Baus der Moleküle die „Winkel“ zwischen den Valenzrichtungen nach Maßgabe der zugeführten Energie Deformations- und Oszillationsschwingungen auszuführen imstande sind, so werden, falls die zugeführte Energie genügend groß ist, Lockerungen bzw. Brüche zwischen den einzelnen Gruppen auftreten können (Ulich-Jost 1957). Bei Bestrahlungen mit Röntgenstrahlen kommt es ausschließlich zu solchen Brüchen und zu Ionisationen. Bei einer Temperatur von  $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  sollen nun diese Glieder (Winkel) mit einer bestimmten Frequenz schwingen. Wird nun durch die UV-Strahlung ein zusätzlicher Energiebetrag von der Größe eines Quants  $E = h\nu$  (für die Wellenlänge  $\lambda = 253,7\text{ m}\mu$  ungefähr  $8\text{mal } 10^{-12}\text{ erg/Quant}$  oder  $10\text{ Kcal je ein Mol Quanten}$ ) hinzugefügt und vom Molekül in die Schwingungsfreiheitsgrade eingebaut (=aktiviertes Molekül), dann kann diese Energiezufuhr zu einer Energiestauung, d. h. zu einer Resonanzschwingung der Bindung eines Atoms oder einer Molekülgruppe und damit zum Bruch dieser Bindung führen. Die bei einem solchen Bruch entstandenen Teilstücke (Radikale oder Ionen organischer Moleküle) sind sehr reaktionsfähig und versuchen möglichst schnell wieder zu einer normalen, chemischen Verbindung zurückzukehren (Alper 1958).



Hierfür gibt es zwei Möglichkeiten:

1. beide Teilstücke können wieder zur Ausgangsverbindung zusammen-treten = Rekombination;
2. die Spaltstücke reagieren mit „artfremden“ Molekülen zu einer neuen Verbindung = Inaktivierung des ursprünglichen Moleküls.

Die Wahrscheinlichkeit der Rekombination der ursprünglichen Spaltstücke ist von der Temperatur abhängig; bei niedriger Temperatur ist die Rekombinationswahrscheinlichkeit viel geringer.

Kühlt man die Eizellen nach der Schädigung sofort auf 4° C ab, dann verringert sich somit die Rekombinationswahrscheinlichkeit eventuell aufgetretener Brüche und die Inaktivierungshäufigkeit wird vergrößert. Daß diese oder ähnliche Reaktionen auch in der *Parascaris*-Eizelle ablaufen, bestätigt die erhöhte Schädigung durch eine anschließende Kältenachbehandlung.

Die Schädigung der *Parascaris*-Eizellen durch UV-Strahlen der Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ , gemessen an der Teilungsverzögerung, ist der eingestrahnten Dosis (Abb. 5 und 6) proportional. Die Proportionalität der Teilungsverzögerung zur eingestrahnten Dosis wurde bereits schon von Fauré-Fremiet (1913) nachgewiesen. Außerdem wird die Teilungsverzögerung vom „Alter“ der Eizellen beeinflusst; vergleiche die Abb. 9, 10 und 11 mit der Abb. 12.

Die schädigende Wirkung der UV-Strahlen auf die Embryonalentwicklung der *Parascaris*-Eizellen wird deutlich, wenn ihre Weiterentwicklung beobachtet wird (Abb. 13, 14, 15, 18, 19 und 20).

Cook (1939) und Evans (1950), die röntgenbestrahlte *Parascaris*-Eier bis zu 6 Monaten bei 5° C aufbewahrten, konnten eine teilweise Erholung der Zellen vom Strahlenschaden nachweisen. Sie vermuten, daß eine längere Unterbindung des Stoffwechselgeschehens die Strahlenerholung begünstige.

Pahl und Bachofer (1955) konnten die Ergebnisse der erstgenannten Autoren nicht bestätigen. Eine Kältenachbehandlung röntgenbestrahlter *Ascaris-suum*-Eizellen führte vielmehr zu einer Dezimierung der überlebenden Embryonen.

Auch bei UV-bestrahlten *Parascaris*-Eizellen, die einer Kältenachbehandlung unterworfen wurden, konnten keine Anzeichen, die für eine Strahlenerholung sprachen, beobachtet werden.

Eizellen, die mit dem UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$  bestrahlt und anschließend 48 Stunden in einer sauerstofffreien Stickstoffatmosphäre aufbewahrt wurden, zeigten ebenfalls keine Strahlenerholung.

Die Erholung röntgenbestrahlter *Ascaris-suum*-Eier nach einer Stickstoffnachbehandlung, Bachofer und Pahl (1957), wird von beiden Autoren auf die Ausschaltung der Cytodhron-Tätigkeit sowie die Unterbindung der Reaktionen von Strahlenprodukten mit dem Atmungssystem zurückgeführt.

Eine teilweise Erholung UV-bestrahlter *Parascaris*-Eizellen, charakterisiert durch die Ausbildung einer Anzahl normaler Embryonen, trat nur ein, wenn die Eier in einer Stickstoff-Atmosphäre be-



strahlt wurden. Diese Ergebnisse deuten offenbar darauf hin, daß für die Erholung UV-bestrahlter *Parascaris*-Eizellen die Ausschaltung der Cytochrome während und nicht nach der Bestrahlung maßgebend ist. Man wäre geneigt, aus diesen Ergebnissen den Schluß abzuleiten, daß möglicherweise der Strahlenschaden durch Reaktionen, zu denen Sauerstoff notwendig ist, fixiert wird; er bestimmt dann den weiteren Entwicklungsablauf.

Wie bereits erwähnt wurde, besteht bei *Arbacia* ein direkter Zusammenhang des ersten Empfindlichkeitsmaximums mit Veränderungen der Viskosität und der Permeabilität (Henshaw und Cohen 1940).

Mit Hilfe der Granulabewegung (RVM) in Verbindung mit der Änderung des Zeitfaktors (Zeitraffer-Film) wurde die Viskosität in *Parascaris*-Eizellen untersucht, die in drei verschiedenen Empfindlichkeitsstadien (Abb. 24) bestrahlt wurden. In Eizellen, die in ihrer empfindlichsten Phase, 0-Std. nach Entnahme, bestrahlt wurden, traten in bezug auf die Viskosität keine sichtbaren Veränderungen auf. Die einzelnen Unterschiede der Kurven dürften wohl auf individuellen Reaktionsunterschieden innerhalb der untersuchten Eizellen beruhen. Die Viskositäts-Untersuchungen vom Entwicklungsbeginn bis zur ersten Teilung (Abb. 21, 22 und 23) mit Hilfe der Zentrifugierung erbrachten nur bei Eizellen, denen eine Dosis von 3000 erg/mm<sup>2</sup> eingestrahlt wurde (Abb. 23), eine sichtbare Änderung. Sie manifestierte sich in einem Parallelverlauf der Kurvenwerte, der sich über eine Zeitspanne von 5 bis 6 Stunden erstreckte. Eine Bestrahlungsdosis von 1500 erg/mm<sup>2</sup> vermag die Viskosität des Cytoplasma nicht zu verändern.

Wird eine Amöbe mit dem UV-Licht eines Hg-Brenners bestrahlt (Heilbrunn und Daugherty 1933), dann sinkt die Viskosität des Plasma sofort nach der Bestrahlung stark ab, um dann erneut anzusteigen. Diesen Vorgang führen beide Autoren auf ein Herauslösen von Ca-Ionen aus dem Cortex zurück. Die Abspaltung der Ca-Ionen führt zu einer Schwächung und zugleich zu einer „Verflüssigung“ des Cortex. Diese freien Ca-Ionen vermögen nun ihrerseits in tiefere Plasmaschichten einzudringen und hier die Umkehr der „Verflüssigung“, nämlich die Koagulation des Eiweißes, zu bewirken.

Den Beweis, daß UV-Strahlen Ca aus der äußeren Plasmaschicht freimachen, konnten Mazia und Clark (1936) an bestrahlten *Elodea*-Blättern liefern. Die Vakuolen dieser Blattzellen enthalten Oxalat, ein Nachweisreagens für Calcium. Werden die Blätter mit UV bestrahlt, dann bilden sich schon nach kurzer Zeit im Zellsaft Ca-Oxalatkristalle. Behandelt man die Blätter vor der Bestrahlung mit einer Oxalat- oder Citrat-Lösung, dann bleibt die Bildung der Kristalle im Zellsaft aus. Dieses Ergebnis besagt, daß die Ca-Ionen, die nach der Bestrahlung unbehandelter Blätter im Zellsaft vom Oxalat gebunden werden, von der äußeren Plasmaschicht stammen.

Anslow, Foster und Klingler (1933) konnten gleichfalls nachweisen, daß UV-Strahlen die Ca-Bindung der Aminosäure (Glycin) durch die photochemische Veränderung der Carboxylgruppe sprengen.

Anzeichen ähnlicher Vorgänge bei der UV-Bestrahlung von *Parascaris*-Eizellen, die einen Vergleich mit den Viskositätsänderungen be-

strahlter Amöben zuließen, finden sich nur in Eizellen (Abb. 28), die 30 Tage nach Uterusentnahme mit dem UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$  bestrahlt wurden. Der langsame Anstieg der Intensität der Granulabewegung (RVM), dessen Maximum in der 5. und 6. Minute nach Teilungsbeginn erreicht wird, könnte vielleicht seine Ursache in der Zerstörung der Ca-Proteidbindung haben. Die sich anschließende Erniedrigung der Intensität der Granulabewegung wäre dann auf die Koagulationswirkung dieser freien Ca-Ionen zurückzuführen.

Aus den Ergebnissen der Untersuchungen über die Granulabewegung (RVM) in Eizellen 30 Tage nach Uterusentnahme (Abb. 26), die mit UV-Licht verschiedener  $\lambda$ -Bereiche des Hg-Brenners HQA 500 bestrahlt wurden, kann nicht eindeutig auf die Wirkung freier Ca-Ionen geschlossen werden; dasselbe gilt auch für Eizellen 7 Tage nach Uterusentnahme (Abb. 25 und 27).

Bemerkenswert ist die abgestufte Wirkung des UV-Lichtes der eingestrahnten Spektralbereiche (Bäckström und WG 6, Bäckström und WG 7 und Bäckström ohne ein zusätzliches UV-Filter) auf die Viskosität des Cytoplasma. Wie die Abb. 26 zeigt, erhöht sich die Wirkung des UV-Lichtes mit zunehmendem Anteil an kurzwelliger Strahlung. Auf „jüngere“ Eizellen, 7 Tage nach Uterusentnahme (Abb. 25), verhalten sich die einzelnen Spektralbereiche annähernd wirkungsgleich. Der verstärkte Einfluß des UV-Lichtes auf die Viskosität des Plasma in „älteren“ Eizellen (vergleiche die Abb. 27 und 28), wird vielleicht durch die chemisch-physikalische „Alterung“ der Eiweißkolloide bedingt; dabei wären ähnliche Reaktionen in Betracht zu ziehen, wie sie bei der Alterung eines anorganischen Kolloids, z. B.  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , auftreten. Eine bedingte Wirkung freier Ca-Ionen auf die Viskosität UV-bestrahlter Zellen kann wohl nicht mehr völlig ausgeschlossen werden; keinesfalls darf aber die Wirkung der UV-Strahlung (Denaturierung und Koagulation) ganz verneint werden. Die Ergebnisse, die auf die oben erwähnte Schädigung hinweisen, sind speziell bei *Parascaris*-Eizellen wohl in der Überzahl.

Das bei den Untersuchungen der Granulabewegung während der Teilung aufgetretene zweite Intensitäts-Maximum fällt in die Anaphase der Mitose und steht vielleicht mit dem Auseinanderweichen der Chromosomen im Zusammenhang. Eine Viskositätserniedrigung während der Anaphase konnte auch von Lamina (1958) an nicht ultrazentrifugierten *Parascaris*-Eizellen nachgewiesen werden. Zweifellos können auch Plasmaausgleichs-Strömungen, die jedoch im *Parascaris*-Ei nicht mit Sicherheit festgestellt werden können, an der Ausbildung des zweiten Maximum beteiligt sein, so wie sie von Kuhl (1941) vor der völligen Durchschnürung der Eizelle von *Psammethinus miliaris* beobachtet wurden.

Anders liegen die Veränderungen der Viskosität während der Mitose im *Chaetopterus*-Ei, Heilbrunn und Wilson (1948). Nach einer vorübergehenden Erhöhung zur Zeit der Asterausbildung erfolgt ein starker Abfall der Viskosität während der Metaphase der Mitose. Mit dem Einsetzen der Teilung kommt es erneut zu einer Erhöhung der Viskosität, die sogar über ihren ursprünglichen Ausgangswert hinausreicht.

Aus den Ergebnissen der Analyse des Teilungsverlaufs UV-bestrahlter Eizellen (Abb. 29, 30 und 31), kann auf keine Behinderung der Bildung der Teilungsfurche geschlossen werden. Man darf als sicher annehmen, daß die Bildung von Fett-Peroxyden (Wilbur, Wolfson u. a. 1957) in der *Parascaris*-Eizelle nicht in dem Ausmaße erfolgt, die eine Veränderung der Geschwindigkeit des Vordringens der Teilungsfurche verursachen könnte. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, daß das Vordringen der Teilungsfurche durch die Viskosität des Plasma nicht beeinflusst wird (Abb. 29, 30 und 31). In den Teilungskurven röntgenbestrahlter Eizellen (Abb. 32) wird diese Unabhängigkeit des Einschneidens der Furche von der Viskosität des Cytoplasma ganz besonders deutlich veranschaulicht. Eier, denen eine Dosis von 48 kr eingestrahlt wurde (Kurve - · - · -), zeigen eine derartig hohe Viskosität, daß man unbedingt eine Wirkung auf die Furchung hätte erwarten müssen. Die Unbeeinflussbarkeit des Vordringens der Teilungsfurche zeigt doch sehr eindrucksvoll die Stabilität jener Plasmabezirke gegenüber ionisierenden und nicht ionisierenden Strahlen, die den Vorgang der Zelldurchschnürung bewirken.

Die Wirkungen der Röntgenstrahlen auf die Viskosität der *Parascaris*-Eizelle ist im wesentlichen die gleiche, wie die der UV-Strahlen. Auf eine Viskositätserniedrigung zu Teilungsbeginn folgt eine Erhöhung, die sich zur eingestrahlten Dosis mehr oder weniger proportional verhält. Auch Pomini (1957) stellte als die Ursache einer Schädigung von *Parascaris*-Eizellen durch  $\gamma$ -Strahlen eine Viskositätsänderung des Cytoplasma fest, die sich durch eine Verlangsamung der Granulabewegung auswies.

Wilbur und Recknagel (1943) andererseits konnten keine Veränderung der Viskosität des Cytoplasma röntgenbestrahlter *Arbacia*-Zellen nachweisen, denen eine Dosis von 50,2 kr eingestrahlt wurde.

Wilson (1950) führt eine sich über 20 Minuten erstreckende, gleichbleibende Viskositätserrhöhung in *Arbacia*-Eizellen auf ein Herausdiffundieren des durch die Röntgenstrahlung von seiner Proteidbildung getrennten Heparins zurück.

Im *Parascaris*-Ei könnte es zweifellos zu einer ähnlichen Reaktion kommen, da das Vorhandensein von Heparin oder heparinähnlichen Substanzen, die eine koagulationshemmende Eigenschaft haben, in sämtlichen Zellen angenommen werden darf. In bezug auf die *Parascaris*-Eizelle müßte das gelöste Heparin in die perivitelline Flüssigkeit diffundieren. Gegen einen derartigen Reaktionsmechanismus sprechen jedoch die beiden ausgeprägten Intensitätsmaxima der Granulabewegung (RVM) in Eizellen, denen eine Dosis von 32 kr eingestrahlt wurde (Abb. 35). Wenn Wilson (1950) bei seinen Untersuchungen bereits mit einer Dosis von 10 kr beachtliche Wirkungen erzielen konnte, so müßte die eingestrahlte Dosis von 32 kr wenn nicht zu großen, aber doch zu merklichen Viskositätsänderungen führen. Eine größere Wirkung dieser Dosis würde gleichzeitig die Proportionalität der Viskosität des Cytoplasma zur eingestrahlten Röntgendosis in der *Parascaris*-Eizelle wiederherstellen.

## VII. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. *Parascaris*-Eier, die zu verschiedenen Zeiten innerhalb des untersuchten Teilungsintervalls (von Kühlschrankentnahme bis zur ersten Teilung) mit UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$  und den Dosen 750, 1500 und 3000 erg/mm<sup>2</sup> bestrahlt wurden, zeigen eine verschiedene Strahlensensibilität.

2. Die Teilungsverzögerung der Eizellen verhält sich umgekehrt proportional zur Zeit, gemessen von der Kühlschrankentnahme der Eier bis zur UV-Bestrahlung.

3. Die Teilungsverzögerung ist von der Größe der eingestrahnten UV-Dosis abhängig.

4. Die Teilungsverzögerung ist vom „Alter“ (Zeitdauer der Uterusaufbewahrung im Kühlschrank) der Eizellen mehr oder weniger abhängig.

5. Innerhalb des untersuchten Intervalls liegt ein Entwicklungsabschnitt, nach dessen Überschreitung die Eizellen für UV-Bestrahlungen unempfindlich werden. Sämtliche Eier, die nach dieser Phase bestrahlt wurden, teilen sich zur gleichen Zeit wie die unbestrahlten Kontrollen.

6. Die Teilungsverzögerung ist von der Temperatur während der UV-Bestrahlung abhängig. In Eizellen, die bei 4° C bestrahlt wurden, sinkt die Empfindlichkeit gegenüber der bei  $20 \pm 0,5^\circ \text{C}$  bestrahlten Eier auf die Hälfte ab. Eine Erholung der Zellen vom Strahlenschaden tritt nicht ein.

7. Eine nach der UV-Bestrahlung sofort einsetzende Kältenachbehandlung erhöht die Teilungsverzögerung der Eizellen und begünstigt ebenfalls nicht die Strahlenerholung der Zellen.

8. Eine Nachbehandlung UV-bestrahlter Eizellen mit Stickstoff führt nicht zur Erholung der *Parascaris*-Eier vom Strahlenschaden.

9. Werden Eizellen in Stickstoff, die Kontrollen in Luft bestrahlt, so treten hinsichtlich der Teilungsverzögerung keine Unterschiede auf. Die Ausbildung zahlreicher, normaler Embryonen der in Stickstoff bestrahlten Eizellen läßt eine teilweise Strahlenerholung erkennen. Die Ursache dieser Erholung kann vielleicht mit einer Ausschaltung oxydativer Prozesse während der Bestrahlung im Zusammenhang stehen.

10. Die Untersuchung UV-bestrahlter Eizellen mit Hilfe der Zentrifugierung erbrachte nur bei Eizellen, denen eine Dosis von 3000 erg/mm<sup>2</sup> eingestrahlt wurde, eine Änderung der Plasmaviskosität.

11. Die mikrokinematischen Untersuchungen der Viskosität mit Hilfe der Granulabewegung (RVM) in Eizellen, die innerhalb von drei verschiedenen Empfindlichkeitsstufen bestrahlt wurden, lassen keine Abhängigkeit einer Viskositätsänderung vom Maximum der Strahlensensibilität der Eizelle erkennen.

12. Die mikrokinematischen Untersuchungen der Granulabewegung (RVM) in *Parascaris*-Eiern, die während der Teilung mit UV-Licht verschiedener Spektralbereiche (Bäckström und WG 6, Bäckström und WG 7 und Bäckström ohne ein zusätzliches UV-Filter) des

Hg-Brenners HQA 500 und der Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$  bestrahlt wurden, zeigen a) einen altersabhängigen Unterschied der Strahlenwirkung auf das lebende Protoplasma; b) eine wellenlängeabhängige Wirkung der UV-Strahlung auf das Cytoplasma.

13. Die Einschnürung der Teilungsfurche kann durch UV der angewandten Spektralbereiche (Bäckström und WG 6, Bäckström und WG 7 und Bäckström ohne ein zusätzliches UV-Filter), der Wellenlänge  $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$  und durch Röntgenstrahlen verschiedener Dosen (8, 16, 32 und 48 kr) nicht beeinflusst werden. Die Einschnürungsgeschwindigkeit der Teilungsfurche ist von der Viskosität des Cytoplasma unabhängig.

14. Die Wirkung der Röntgenstrahlen auf die Viskosität des Cytoplasma verhält sich annähernd proportional der eingestrahlt Dosis.

15. Die Absorptionsmessung des UV-Lichtes der beiden Hg-Brenner HQA 500 und HNS 12 durch die *Parascaris*-Eizelle ergab für die HNS-12-Strahlung den Wert 1,52 und für die HQA-500-Strahlung den Wert 1,18. Die Meßwerte zeigen eine stärkere Absorption der HNS-12-Strahlung ( $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$ ) durch die Eizelle.

#### Literatur

- Alper, T., 1958: A mechanism for the oxygen effect suggested by recent experiments. Organic peroxyds in radiobiology. Pergamon Press, London-New York-Los Angeles.
- Anslow, G. A., M. L. Foster, and C. Klingler, 1933: The absorption spectra of glycine solutions and their interpretation. J. Biol. Chem. 103, 81—92.
- Bachofer, C. S., and G. Pahl, 1955: Influence of extended temperature treatments on recovery X-irradiated *Ascaris* eggs. Radiation Res. 2, 50—63.
- Bäckström, H. L., 1940: Über die Ultraviolett-Absorption der Kobaltsalze und über einige Lichtfilter für das ultraviolette Strahlengebiet. Arkiv Kemi (Mineral. Geol.) 13 a, Nr. 24.
- Bećarević, A., 1957: Action des rayons ultraviolets sur l'adaptation enzymatique et de l'effet de l'extrait de Levure sur la restauration de la synthèse enzymatique. Biochim. Biophys. Acta 25, 299—305.
- Blum, H., and J. Price, 1950: Delay of cleavage of the *Arbacia* egg by ultraviolet radiation. J. Gen. Physiol. (Am.) 33, 285—303.
- Clark, H. J., 1936: The denaturation of egg albumin by ultraviolet radiation. J. Gen. Physiol. (Am.) 19, 199—210.
- Cook, E. V., 1939: Influence of low temperature on recovery from roentgen rays. Radiology 32, 289—293.
- Cronheim, G., 1937: Über die Wirkung von Strahlung auf Fermente und fermentative Prozesse. Enzymologia (Festschrift I) 3, 115—137.
- Dognon, A., and H. Biancani, 1948: Actions des radiations sur les cellules et les tissus. Tabulae Biologicae 19.
- Duggar, B. M., 1936: Biological effects of radiations. Mac-Hill Book Comp., New York.
- Evans, T. C., 1950: Some effects of X rays on the mechanisms of cell division. Biol. Bull. 99, 317.

- Einstein, A., 1922: Untersuchungen über die Theorie der „Brownschen Bewegung“. Ostwalds Klassiker Nr. 199, Leipzig 1922.
- Fauré-Fremiet, E., 1913: Le cycle germinatif chez l'*Ascaris megaloccephala*. Arch. Anat. micr. 15, 435.
- Gentner, W., 1930: Die Wirkungen der kurzwelligen Strahlung auf Eiweißkörper. Biochim. Z. 227, 286—303.
- Giese, A., 1938: The effect of ultra-violet radiation of  $\lambda 2537 \text{ \AA}$  upon cleavage of sea urchin eggs. Biol. Bull. 74, 330—341.
- Henshaw, P. S., and I. Cohen, 1940: Further studies on the actions of roentgen rays on the gametes of *Arbacia punctulata*. IV. Changes in the radiosensitivity during the first cleavage cycle. Am. J. Roent. Rad. Ther. 43, 917—920.
- and D. S. Francis, 1936: The effect of X-rays on cleavage in *Arbacia* eggs. Evidence of nuclear control of division rate. Biol. Bull. 70, 28—35.
- 1940: Further studies on the action of roentgen rays on the gametes of *Arbacia punctulata*. II. Modification of the mitotic time schedule in the eggs by exposure of the gametes to roentgen rays. Am. J. Roent. Rad. Ther. 43, 907—912.
- Heilbrunn, L. V., 1956: The dynamics of living protoplasm. Academic Press Inc., New York.
- 1928: The Colloid Chemistry of Protoplasm. Borntraeger, Berlin.
- and K. Daugherty, 1935: The action of ultraviolet rays on *Amoeba proteus*. Protoplasma 18, 596—619.
- and W. L. Wilson, 1948: Protoplasmic Viscosity changes during mitosis in the egg of *Chaetopterus*. Biol. Bull. 95, 57—68.
- Hollaender, A., 1955: Radiation Biology. MacGraw-Hill Book Comp., Inc. New York.
- Kuhl, W., 1941: Die Entwicklung des Seeigelleies (*Psammehinus miliaris*). Hochschulfilm C 382, mit Beiheft.
- 1949 a: Neue Ergebnisse zur Cytodynamik der Befruchtung und Furchung des Eies von *Psammehinus miliaris* (Gmel). Zool. Jahrbücher 70, Heft 1.
- 1949 b: Die technischen Grundlagen der Kinematischen Zellforschung. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen.
- Lamina, J., 1958: Untersuchungen über den Einfluß der Ultrazentrifugierung auf den Bewegungs-, Teilungs- und Entwicklungsrythmus des Eies von *Parascaris equorum* (Goeze) mit Hilfe des Zeitrafferfilms. Inaugural-Dissertation.
- Lea, D. E., 1955: Actions of Radiations on living cells. Cambridge 1955.
- Mazia, D., and J. M. Clark, 1956: Free Calcium in the action of stimulating agents on *Elodea* cells. Biol. Bull. 71, 306—323.
- Meyer, A., and O. Seitz, 1949: Ultraviolette Strahlen. W. de Gruyter & Co., Berlin.
- Pahl, G., and C. S. Bachhofer, 1957: Anaerobic recovery of *Ascaris* eggs from X-irradiation. Biol. Bull. 112, 385—389.
- Pekarek, J., 1930: Absolute Viskositätsmessungen mit Hilfe der Brownschen Molekularbewegung. Protoplasma 10, 510.
- Rajewsky, B., 1929: Weitere Untersuchungen an der Strahlenreaktion des Eiweißes. Strahlentherapie 33.
- Ries, E., and M. Gersch, 1953: Biologie der Zelle. B. G. Teubner Verlagsgesellschaft, Leipzig.
- Scheibe, G., 1947: Diskussionsbemerkungen auf der Biophysikalischen Tagung Januar 1947 in Mosbach (Bd.).
- Schleip, W., 1923: Die Wirkung des UV-Lichtes auf die morphologischen Bestandteile des *Ascaris*-Eies. Arch. Zellf. 17.



- Schwöbel, W., 1952: Untersuchungen zur Granulabewegung im Ei von *Parascaris equorum* (Goeze) mit Hilfe des Zeitrafferfilms. *Protoplasma* **XLI**.
- Setlow, R., and B. Doyle, 1953: The effect of light of the wavelength 253.7 m $\mu$  on proteins and nucleic acid at low temperature. *Biochim. Biophys. Acta* **12**, 508—515.
- Shirley, E., and H. Finley, 1949: The effects of ultraviolet radiations on *Spirostomum ambiguum*. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* **68**.
- Torriani, A. M., 1956: Effects d'irradiation ultraviolette sur la biosynthèse induit de la pénicillinase de *Bacillus cereus*. *Biochim. Biophys. Acta* **19**, 224—235.
- Ulich-Jost, 1957: Lehrbuch der physikalischen Chemie. Verlag Dr. Dietrich Steinkopff, Darmstadt.
- Wilbur, K. M., u. a., 1957: Inhibition of cell division by ultraviolet irradiated unsaturated fatty acid. *Exper. Cell Res.* **15**.
- and R. O. Recknagel, 1943: The radiosensitivity of eggs of *Arbacia punctulata* in various salt solutions. *Biol. Bull.* **85**, 193—200.
- Wilson, W. L., 1950: The effect of roentgen rays on protoplasmic viscosity changes during mitosis. *Protoplasma* **39**, 305—317.
- and L. V. Heilbrunn, 1952: The protoplasmic cortex in relation to stimulation. *Biol. Bull.* **103**, 139—144.



# Über die Einwirkung von kurzwelligem Licht auf die basischen Vitalfarbstoffe Neutralrot, Pyronin und Janusgrün B

Von

**Henning Sauer**

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. Dezember 1959)

## Einleitung

Über die Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie schreiben Bräutigam und Grabner (1949) in einem Beitrag zum Gedenken an Max Haitinger, den Begründer dieser neuen Forschungsmethode: „Apparativ ist die Fluoreszenzmikroskopie in ihren großen Umrissen fertig ausgebildet, und eine weitere apparative Entwicklung ist hauptsächlich nur in der Richtung zu erwarten, daß neue und verbesserte Strahlungsquellen noch stärkere Fluoreszenzen erregen werden.“

Mit dem Vorteil, den die Fluorochromierung gegenüber einer Diachromierung bietet, müssen aber auch mancherlei Nachteile in Kauf genommen werden. So sind die kurzwelligen, energiereichen Strahlen von erheblichem Einfluß auf den lebenden Organismus. Dieser wird um so stärker sein, je mehr man die Strahlenintensität durch Verwendung moderner Quecksilberhöchstdrucklampen erhöht.

Für die Epidermiszellen der Schuppenblätter von *Allium cepa*, die häufig für zellphysiologische Untersuchungen herangezogen werden, liegen verschiedene Angaben über eine UV-Strahlenwirkung vor, so von Biebl (1942 a, b, 1947), Drawert (1952), Glubrecht (1953). Es zeigt sich, daß der Kern und das Plasma hauptsächlich die Wellenlängen unter  $315\text{ m}\mu$  absorbieren (Glubrecht 1956). In diesem Wellenbereich treten die Strahlenschädigungen auch zuerst auf. Das energieärmere blaue Licht (320 bis  $500\text{ m}\mu$ ) dagegen erweist sich als relativ unschädlich (Biebl und Uhl 1958).

Bei den Strahlenreaktionen kann es sich 1. um eine direkte Einwirkung auf das lebende System handeln oder 2. um die schwer analysierbaren sogenannten „photodynamischen Einwirkungen“ (Tappeiner und

Jodlbauer 1907), bei denen die Anregungsenergie durch sensibilisierende Farbstoffe sekundär auf die lebende Materie übertragen wird. Eine zusammenfassende Darstellung gibt Simonis (1956).

Über eine sehr schnelle und empfindliche Reaktion vitalgefärbter Zellen auf kurzwelliges Licht berichtet Strugger (1940 a) bei seinen Untersuchungen über das Neutralrot. Er konnte den Nachweis erbringen, daß der Farbstoff auch im Plasma, und zwar wahrscheinlich in Form seiner fluoreszierenden Base, in lipoiden Phasen gespeichert wird. Während der fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung beginnen die zuerst dunkel erscheinenden Vakuolen nach und nach grün bis grüngelb zu fluoreszieren.

Aus den Untersuchungen von Drawert und Metzner (1956) geht hervor, daß es sich bei dieser Strahlenreaktion um eine Veränderung des von der Zelle gespeicherten Farbstoffs handelt. Aus dem kationischen Neutralrot entsteht durch die Strahleneinwirkung eine negativ geladene, grün fluoreszierende Verbindung. Die lebende Zelle erweist sich also in diesem Fall gegenüber den UV-Strahlen als wesentlich beständiger als der synthetische Farbstoff.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung muß deshalb außer den beiden bereits angeführten Reaktionen kurzwelliger Strahlen auf vitalgefärbte Objekte, der direkten oder der indirekten, photodynamischen Einwirkung, als dritte Möglichkeit noch eine Änderung der verwendeten Farbstoffe in Betracht gezogen werden.

Die Beobachtungen von Drawert und Metzner (1956) über die Veränderung des Neutralrots sollen im folgenden näher analysiert werden.

Nachdem es sich einmal gezeigt hat, daß selbst bei der Kürze der mikroskopischen Beobachtungszeiten mit Reaktionen der verwendeten Farbstoffe zu rechnen ist, erscheint es notwendig, weitere Angaben in der Literatur zu überprüfen, ob nicht die dort beschriebenen Veränderungen des Fluoreszenzbildes ebenfalls auf eine Beeinflussung des Farbstoffes zurückgeführt werden können.

So berichtet z. B. Strugger (1941) von einer reversiblen Strahleneinwirkung auf pflanzliche Protoplasten, die mit Pyronin vitalgefärbt waren. Besonders seit der Benutzung der intensiven Quecksilberhochdrucklampen als Erregerlicht mehrten sich die Angaben, daß eine Fluorochromierung bestimmter Granula immer erst einige Zeit, nachdem das gefärbte Objekt dem kurzwelligen Licht ausgesetzt worden ist, erzielt werden kann (Drawert 1953; Drawert und Kärber 1956; Kärber 1958; Kuttig 1957; Mix 1958).

In diesem Zusammenhang ist auch eine Mitteilung von Gutz (1958) von Interesse, der seine Versuche über die Granulafluorochromierung von Pilzmycelien (Gutz 1956) mit einer lichtstärkeren Fluoreszenzeinrichtung wiederholt hat. Danach wird die durch Reduktionsprozesse der lebenden Objekte hervorgerufene Granulafluoreszenz mit Nilblau bei einer intensiven Bestrahlung wesentlich schneller erreicht als bei Verwendung eines Kohlebogen-Erregerlichtes. Aber auch am fixierten Material werden Fluoreszenzveränderungen beobachtet. Dies deutet ebenfalls auf eine Beeinflussung des Farbstoffes hin.

### Material und Methode

Im Verlauf der Untersuchungen fanden folgende Farbstoffe bzw. Fabrikate Verwendung:

Neutralrot (Chroma). Nach den Untersuchungen von Drawert und Metzner (1956) verhält sich der Farbstoff übereinstimmend mit den Präparaten von Bayer und von Merck.

Pyronin (Grübler-Chroma, Schuchardt-Görlitz und Merck). P. extra (Grübler-Chroma). P. stand. (Bayer), Pyronin B echt stand. (Bayer), Akridinrot (Grübler). Janusgrün B (IG und Grübler Bln.-West).

Safranin O (Chroma), S. T. (Merck), S. stand. (Grübler-Leipzig), Phenosafranin stand. (Bayer), Methylenviolett (Hollborn & S., Leipzig), M. stand. (Bayer).

Für die vergleichenden Vitalfärbungen benutzte ich die Oberepidermis der Schuppenblätter von *Allium cepa*. Die Präparation erfolgte in der von Strugger (1949) angegebenen Weise.

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden mit der großen Fluoreszenzeinrichtung von Zeiss-Winkel durchgeführt, mit einer Quecksilberhöchstdrucklampe (Type Osram HBO 200) als Erregerlicht. Für den Höchstdruckbrenner wird eine Brenndauer von etwa 200 Std. angegeben. Nach einem Betrieb von 20 bis 40 Std. macht sich jedoch eine deutliche Abnahme der Strahlungsintensität bemerkbar. Dies ist an verschiedenen Bestrahlungseffekten, wie dem Ausbleiben von Fluoreszenzlösungen und von Schädigungen bei Vitalfärbversuchen, zu erkennen. Quantitative Messungen über die Lichtstärke und über qualitative Änderungen konnten nicht durchgeführt werden; so sind im folgenden stets nur die verschiedenen Einwirkungszeiten angegeben. Es soll aber darauf hingewiesen werden, daß das Alter des Brenners darüber entscheiden kann, ob überhaupt oder nach welcher Zeit eine Reaktion festzustellen ist.

Die Beobachtung (Neutralrot, Janusgrün, Fluoreszent X) erfolgte hauptsächlich im Blaulicht (Filter 2 × BG 12, 3 mm, Sperrfilter OG 4 + OG 5). Für Untersuchungen im UV-Licht (Pyronin) diente die Filterzusammenstellung UG 2, 2 mm + UG 5, 2 mm zur Erregung und BG 23 + GG 4 als Strahlensperre.

Um schnelle Veränderungen des Fluoreszenzbildes durch die starke Strahlenwirkung zu vermeiden, wurden vergleichsweise auch immer Fluoreszenzmikroskope schwächerer Lichtintensität verwendet. Dazu standen das Stativ BX der Fa. Leitz-Wetzlar (mit Mantelkohlen) und ein Zeiss-Winkel-Standardmikroskop in Verbindung mit einer Mikroprojektionseinrichtung der gleichen Firma zur Verfügung, wie es auch Gutz (1956) benutzte. Dieses Gerät besitzt den geringsten Anteil an kurzwelligen Strahlen und läßt deswegen die Bestrahlungseffekte teils gar nicht oder erst nach relativ langer Zeit erkennen.

Die Bestrahlungen der reinen Farbstofflösungen in vitro wurden mit einer Hochleistungsmikroskopierleuchte von Zeiss-Winkel durchgeführt, die zuerst mit dem Quecksilberbrenner HBO 74 ausgestattet war. Für eine präparative Gewinnung der unter der Lichteinwirkung entstandenen Produkte erwies sich die Intensität dieses Brenners jedoch als zu gering, so daß er gegen den Brenner HBO 200 ausgetauscht wurde. Für diese Versuche wurde die ungefilterte Strahlung ausgenutzt. Verschiedene Filter (UG 1, UG 5, BG 12 u. a.) kamen nur für orientierende Untersuchungen zur Anwendung. Die Farbstofflösungen befanden sich in kreisrunden Küvetten (Durchmesser 5 cm, Dicke 2 cm) mit Halsansatz aus gewöhnlichem Glas, die den Querschnitt des Strahlenkegels in 2 cm Abstand vor den Filterhaltern der Lampe genau ausfüllten.

Um die Versuche auch bei Sauerstoffabschluß durchzuführen, mußte auf die Küvetten ein Gaswascheinsatz mit Schliff aufgesetzt werden. Obwohl für diese

Versuche Glühlampenreinstickstoff (Osram,  $O_2$ -Gehalt  $< 1 \cdot 10^{-4}\%$ ), der zur weiteren Desoxygenierung mehrere Vorlagen mit alkalischer Pyrogallollösung durchperlte, verwendet wurde, durfte beim Arbeiten mit reduzierten Farbstoffen während der Dauer der Lichteinwirkung kein ständiger Stickstoffstrom hindurchgeleitet werden, da die immer noch vorhandenen Sauerstoffspuren nach und nach zu einer Reoxydation führten. Nach Reduktion mit  $Na_2S_2O_4$ , Rongalit oder Wasserstoff mit Palladium als Katalysator (Palladium-Lösung nach P a a l, Schuchardt-München) und Aufsättigung der Lösung mit Stickstoff mußte die Gaszufuhr abgeklemmt werden. Für einen Druckausgleich während der durch die Strahlen bedingten Erwärmung sorgte dann eine Schlauchverbindung, die über ein leeres Vorschaltgefäß wieder in eine Pyrogallollösung führte, um beim Abkühlen eine Reoxydation zu verhindern.

Es war notwendig, für Ausschüttelungsversuche von reduzierten und bestrahlten Farbstofflösungen mit organischen Medien auch diese vorher gründlich zu desoxygenieren. Mit Hilfe eines in die Küvette eingeschliffenen Schütteltrichters konnte das hydrophobe Lösungsmittel ohne Sauerstoffzutritt zu der Farblösung hinzugegeben werden (Abb. 1).

Für die chromatographischen Analysen wurde das Papier Nr. 2043 b von Schleicher und Schüll, als mobile Phase ein Aceton-Leitungswassergemisch (4:6) und für die präparative säulenchromatographische Aufarbeitung das Zellulosepulver Nr. 123 der gleichen Firma benutzt.

Zur Untersuchung der Ladungseigenschaften der Farbstoffe und Bestrahlungsprodukte dienten das Papierelektrophoresegerät „Elphor“ nach Graßmann und Hanning von Dr. Bender und Dr. Hobein (Karlsruhe-München-Zürich) und die dazugehörigen Filtrierpapierstreifen Nr. 2043 a Mgl von Schleicher und Schüll. Die angelegte Spannung betrug 110 V, bei einem Strom von 0,4 mA je Streifen. Eine nähere Beschreibung des Apparates findet sich bei Wunderly (1955). Als Durchtränkungsflüssigkeit wurden die Phosphatpuffer (Strugger 1949) in doppelter Konzentration (m/75) verwendet. Um genau kontrollierbare Bedingungen zu haben, mußten zuerst die möglichen Aziditäts-Veränderungen während der Betriebszeiten gemessen werden. Bei einer durchschnittlichen Laufzeit von 5 bis 8, gelegentlich auch bis zu 20 Std., traten im sauren Bereich pH-Verschiebungen um  $\pm 0,2$  und im alkalischen Bereich um  $-0,5$  bis  $-1$  auf.

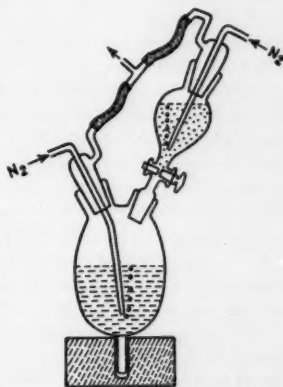


Abb. 1. Küvette für Bestrahlungs- und Ausschüttelungsversuche in einer Stickstoffatmosphäre.

## I. Versuche mit Neutralrot

### A. Die Einwirkung von UV-Strahlen auf Neutralrotlösungen

#### a) Bestrahlungen von Neutralrotlösungen

Nach Drawert und Metzner (1956) geht aus den Elektrophoreseversuchen hervor, „daß der basische, also positiv geladene Farbstoff Neutralrot, wenn er nicht im völlig dissoziierten Zustand (pH 2) vorliegt, unter der Strahlenwirkung einer Quecksilberhöchst- oder Kohlenbogenlampe eine grünfluoreszierende, negativ geladene Komponente abspaltet“.

Durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von Farbstofflösungen, die bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen bestrahlt wurden, und durch eine chromatographische Analyse konnte dies bestätigt werden. Die besten Ergebnisse erzielt man, wenn das Neutralrot (NR) als undissoziierte Base vorliegt.

In diesem Zusammenhang muß auf die spektralphotometrischen Untersuchungen von Bartels (1956 a und b) hingewiesen werden, der bei wässrigen Neutralrotlösungen eine starke Assoziationsbildung feststellte. Schon bei geringer Konzentration (1:500.000) liegt ein Teil der NR-Ionen als Dimere vor, bei höher konzentrierten Lösungen ( $5 \cdot 10^{-4}$  Mol/l = etwa 1:8000) werden mit großer Wahrscheinlichkeit Tetramere gebildet. Die Assoziation zu Dimeren führt bei fluoreszierenden Farbstoffen häufig zu einer beträchtlichen Herabsetzung der Fluoreszenzausbeute. Das Assoziationsverhalten wässriger NR-Lösungen könnte auch für die Strahlenwirkung von Bedeutung sein.

Bei den Versuchen erweist es sich als störend, daß die Farbbase schwer wasserlöslich ist und bei pH 6,8–7,0 leicht ausflockt; denn nur die gelöst vorliegenden Moleküle der Farbbase sind unter diesen Versuchsbedingungen strahlenempfindlich. Eine abgestandene, gesättigte wäßrige NR-Basenlösung entspricht nur einer Konzentration von etwa 1:25.000 =  $1,6 \cdot 10^{-4}$  Mol/l. Ich erhielt diesen Wert, indem ich eine alkalische filtrierte Farblösung mit einem Tropfen HCl versetzte und die Farbtiefe mit einer angesäuerten NR-Lösung bekannter Konzentration verglich. Deshalb erwies es sich als günstig, die NR-Base durch Ausschüttelung in einem neutralen hydrophoben Lösungsmittel anzureichern. Die Konzentration kann so mindestens auf das Zehnfache erhöht werden.

Bei Bestrahlung mit der Quecksilberhochdrucklampe erwärmt sich das Lösungsmittel stark, wenn keine besonderen Kühlvorrichtungen zur Verfügung stehen. Da Temperaturen bis zu 95° C gemessen wurden, konnte nur eine schwer siedende Flüssigkeit verwendet werden. Am besten eignete sich dazu Toluol (Siedepunkt 112° C). Nach guter Durchmischung auf der Schüttelmaschine und gründlicher Phasentrennung wurde die rein orangegelbe, gelbgrün fluoreszierende Lösung für 30 Minuten der energiereichen Strahlung ausgesetzt. Eine Reaktion findet sowohl im Blaulicht als auch im ultravioletten Bereich statt. Je nach dem Alter des Quecksilberbrenners wird mehr oder weniger schnell eine Umfärbung nach Rot sichtbar. Es bildet sich zuerst ein feiner Niederschlag, der sich bald in größeren Flocken absetzt. Die restliche Lösung zeigt nur noch einen blaßgelben Farbton, die intensive Fluoreszenz ist gelöscht. Durch scharfes Zentrifugieren läßt sich das Sediment abtrennen. Es enthält hauptsächlich die negativ geladenen Anteile mit Beimengungen von unverändertem NR. Häufig zeigt das Toluol auch dann noch einen rötlichen Farbton. Durch Ausschütteln mit destilliertem Wasser können die sauren, lipophoben Komponenten völlig herausgelöst und später zusammen mit dem Niederschlag aufgearbeitet werden. Es empfiehlt sich, das bereits bestrahlte Toluol wieder frisch mit der Farbbase anzureichern und für weitere Reaktionen zu verwenden. Im Toluol befindet sich eine rein hydrophobe Komponente, von der weiter unten noch zu berichten ist (S. 532).

Der Niederschlag wurde zur restlosen Entfernung des Lösungsmittels bei 60 bis 80° C getrocknet. Die Erwärmung verursacht keine Veränderung der Substanz, da ja auch beim Bestrahlungsvorgang ähnliche Temperaturen auftreten. Überhaupt ist der negativ geladene Stoff gut hitzebeständig, so daß Lösungen ohne Schaden bei 100° C eingedampft werden können.

Der Niederschlag löst sich in 90%igem Alkohol beim Erwärmen. Zurück bleibt eine geringe Menge eines ganz feinen dunkelbraunen Pulvers, das sich weder in

wäßrigen noch in hydrophoben Medien lösen läßt und nicht weiter untersucht wurde. Zur weiteren Reinigung muß der Alkohol aus der mit Wasser verdünnten Lösung wieder abdestilliert werden. Steht genügend intensiv bestrahlte Lösung zur Verfügung, so bildet sich beim Entfernen des Alkohols aus der wäßrigen Lösung ein feiner Niederschlag. Er ist mit der bereits erwähnten „hydrophoben Komponente“ identisch.

#### *b) Versuche zur Reingewinnung des Bestrahlungsproduktes*

Drawert und Metzner (1956) zeigten, daß eine gute Abtrennung der grün fluoreszierenden Komponente vom unveränderten NR mit Hilfe der Papierchromatographie erreicht wird (Abb. 3, S. 374). Die Trennung ist exakt durchführbar, jedoch können durch Eluieren der Farbflecke nur schwache Farblösungen gewonnen werden. Ergiebiger ist die Ausschüttelung der alkalisch gepufferten bestrahlten Farblösungen mit neutralen hydrophoben Lösungsmitteln wie Toluol oder Benzol. Entsprechend der Farbstoffverteilung zwischen beiden Medien (Drawert 1940, 1948) läßt sich das unveränderte NR durch wiederholten Wechsel der organischen Lösung fast völlig herauslösen. Dazu ist es jedoch notwendig, alkalische Puffer zu verwenden, die sich nicht ohne weiteres wieder entfernen lassen.

Durch Aluminiumoxyd (Woelm) findet keine Trennung der Komponenten statt. Eine einfache Kapillaranalyse (Ruhland 1908; Strugger 1949) durch Auftropfen der bestrahlten Lösung auf ein Fließpapier zeigt, daß das Neutralrot als Farbkation zentral adsorbiert wird, während sich ein grün fluoreszierender Ring nach außen ausbreitet. Der rote Fleck bleibt auch beim Nachsaugen von Wasser unverändert liegen.

Zur Reinigung wurde deshalb Zellulosepulver verwendet (Schleicher & Schüll, Nr. 123). Als Säule dienten Glasfilternutschen verschiedener Größe, die sich bequem füllen ließen. Das Fortschreiten der Adsorptionszone des roten Farbstoffs war auf diese Weise gut zu verfolgen. Aus anderen Versuchen ging hervor, daß zur Festlegung von 1 g NR etwa 100 bis 110 g Zellulosepulver nötig sind. Zur Beschleunigung der Trennung wurde die Lösung im Vakuum durchgesogen; dank der großen Oberfläche des staubfeinen Pulvers wird das NR völlig adsorbiert, während die anionische Komponente glatt hindurchläuft.

Vor der Verwendung des Zellulosepulvers ist eine Reinigung notwendig. Der erste Anteil der durch die Säule gelaufenen Lösung zeigt eine der anionischen Komponente ähnliche bräunlichgelbe Farbe, aber eine hellblaue Fluoreszenz. Im Papierchromatogramm war ein entsprechender Fleck nicht nachzuweisen. Die leichte Opaleszenz des Filtrates ließ vermuten, daß es sich hierbei um einen löslichen Anteil des Zellulosepulvers handelte. Eine größere Menge Pulver wurde daraufhin durch häufiges Durchsaugen von destilliertem Wasser gewaschen, bis das Filtrat klar blieb. Beim Einengen der Waschlösung wurde eine etwas klebrige braune Masse gewonnen, die nach Säurehydrolyse deutliche Fehling-Reaktion gab.

Ein Versuch, das Zellulosepulver im großen zu reinigen, scheiterte, da nach dem Trocknen bei 60 bis 80° C wieder lösliche Bestandteile auftraten. So mußte die Zellulose vor jedem Versuch gründlich gewaschen werden. Wird ein anderes Lösungsmittel als Wasser verwendet (Aceton, Alkohol), so muß auch mit diesem das Pulver vorbehandelt werden.

Nach dem Passieren der Säule (chromatographische Prüfung auf Abwesenheit von unverändertem NR, sonst Wiederholung des Vorganges) und gründlichem Auswaschen der anionischen Komponente wurde die gewonnene Lösung auf dem Wasserbad bis zur Trockene eingedampft. Eine dunkelbraun glänzende Kruste blieb zurück, die leicht abgekratzt und zu einem feinen Pulver zerstoßen werden konnte.



Zur Frage der Ausbeute sei erwähnt, daß sich aus einem Ansatz von 40 je eine halbe Stunde bestrahlten Küvetten von 25 bis 30 cm<sup>3</sup> Toluollösung ungefähr 350 mg Substanz gewinnen ließen. Das entspricht einer Gesamteinwirkung von 20 Stunden auf 1000 cm<sup>3</sup> Lösung.

Hieraus wurde eine „Stammlösung A“ 1 : 1000 mit Aqua bidest. hergestellt. Sie hat einen pH-Wert von ungefähr 6,4 (pH Aqua bidest. = 6,1), ist braungelb gefärbt und fluoresziert gelbgrün. Im diffusen Licht ist die Lösung über Monate unverändert haltbar.

### c) Vitalfärbungen mit dem anionischen Bestrahlungsprodukt

Als Untersuchungsobjekt wurden in Übereinstimmung mit den Neutralrot-Arbeiten von Strugger (1940 a), Toth (1952), Drawert und Metzner (1956) wiederum die Oberepidermiszellen von *Allium cepa* herangezogen (Zittauer Gelbe). Die Farbkonzentration der Pufferlösungen betrug 1 : 10 000. Die Färbezeiten variierten zwischen 5 Minuten und mehreren Stunden. Im Hellfeld war keine Farbstoffspeicherung zu beobachten. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung ergab folgendes Bild:

- pH 2,4: Die Membran ist ungefärbt, der Farbstoff aber im Plasma mit intensiver gelber Fluoreszenz gespeichert. Deutlich heben sich die einzelnen Plasmastränge von der dunklen Vakuole ab. Die Kerne fluoreszieren gelb. Einige Zellen zeigen Vakuolenkontraktion oder eine Aufquellung des ganzen Plasmaschlauches, der dann homogen gelb gefärbt ist. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um nicht mehr voll vitale Zellen (Plasmolyse in Rohrzucker noch normal), da beim längeren Verweilen in der sauren Pufferlösung alle Zellen absterben. Während der Beobachtung nimmt die Fluoreszenzintensität etwas ab.
- pH 3,5: Gute Plasma- und Kernfluoreszenz. Nach einiger Zeit sind noch 40% der Zellen lebend und zeigen deutliche Plasmaströmung. Es handelt sich hier um eine Anfärbung der Plasmagrundsubstanz, eine Granulafluoreszenz ist nicht zu beobachten. Die toten Wundrandzellen bleiben völlig farblos. Während der Beobachtung tritt stärkere Fluoreszenzschwächung auf.
- pH 4,5: Das Farbbild entspricht dem bei pH 3,5, die Fluoreszenzintensität ist schwächer und blaßt während der Beobachtung auch schneller aus. Bei allen untersuchten pH-Werten ist auf dem Epidermishäutchen ein Längsgradient der Fluoreszenzstärke zu bemerken.
- pH 5,4: Das Plasma wird nur noch schwach angefärbt, der Fluoreszenzton ist etwas grünlicher.
- pH 5,9: Bei längeren Färbezeiten ist eine geringe Plasmafluoreszenz gerade noch wahrnehmbar.
- pH 6,3: Eine Fluoreszenz des Plasmas ist nicht mehr nachweisbar. Der Farbstoff zeigt somit ein Verhalten, wie es von sauren Oxyfluoronfarbstoffen bekannt ist (Drawert 1941).

Die Aufnahme der negativ geladenen Bestrahlungskomponente erfolgt am besten im stark sauren pH-Bereich. Auf die schwächere Speicherung bei Verringerung der Acidität der Pufferlösungen ist auch die schnellere Fluoreszenzverminderung zurückzuführen. Die Aufnahme ist ebenso bei Sauerstoffabwesenheit zu beobachten. Dies deutet darauf hin, daß hier ein reiner Lösungsvorgang in lipophilen Phasen des Plasmas vorliegt. Bei Übertragung in alkalische Puffer wandert der Farbstoff bald wieder aus. Drawert und Metzner (1956) konnten keinen Unterschied in dem vital-



färberischen Verhalten von bestrahlten und unbestrahlten Neutralrotlösungen feststellen. Dies ist auch bei dem geringen Anteil der sauren Komponente in wäßrigen Lösungen nicht möglich, da höchstens im sehr sauren Gebiet eine Speicherung eintritt, während im neutralen Puffer die aufgenommene Neutralrotbase durch ihre intensive Fluoreszenz alles überdeckt. Wird der saure Stoff von außen der Zelle geboten, so kommt es zu keiner Zellsaftfluoreszenz. Diese kann nur durch Bestrahlung von Vakuolen erreicht werden, die mit normalem NR angefärbt sind.

*d) Ausschüttelungsversuche, Löslichkeit und Verhalten im elektrischen Feld*

Zur Prüfung auf Lipoidlöslichkeit führte ich Ausschüttelungsversuche der gepufferten Farblösungen mit Benzol durch. Im Vergleich hierzu sei auf die Verteilung des unveränderten Neutralrots zwischen einer hydrophilen und einer hydrophoben Phase hingewiesen, wie sie *Drawert* (1940, 1948) gibt. Als Puffer dienten  $n\text{-HCl}$ ,  $m/30$  Phosphatlösungen und  $n\text{-KOH}$ . Dank der relativ hohen Salzkonzentration und dem fast neutralen pH-Wert der Stammlösung waren nur ganz geringfügige Aziditätsveränderungen zwischen den reinen Pufferlösungen und den Farbpuffern zu beobachten. Die Ergebnisse sind der Tab. 1 zu entnehmen.

Im stark sauren Gebiet hat die Lösung eine rote Eigenfarbe. Bei Vergrößerung der Wasserstoffionenkonzentration tritt ein Farbumschlag nach Gelb ein. Die fast reingelbe (bei stärkerer Verdünnung mehr grüngelbe) Fluoreszenz ist im Bereich von pH 5–10 am intensivsten, mit zunehmender Ansäuerung wird die Fluoreszenz gelöscht. Auch die stark alkalischen Lösungen zeigen eine geringe Fluoreszenzverminderung. Bei der Ausschüttelungsreihe mit Benzol weist dieses von pH 6 abwärts eine stärker werdende gelblichgrüne Fluoreszenz auf. Die Eigenfarbe ist schwach gelblich. In der wäßrigen Phase ist keinerlei Unterschied zu der nicht ausgeschüttelten Lösung festzustellen.

Ein Vergleich mit den Ergebnissen der Vitalfärbung zeigt gute Übereinstimmung. Bei Ansäuerung finden wir eine zunehmende Lipoidlöslichkeit, was auf eine Zurückdrängung der Dissoziation und Bildung der Farbsäure hinweist. Allerdings scheinen sich nur geringe Spuren im Benzol zu lösen. Ausschüttelungen mit Toluol, Xylol, Hexan, Äther und Chloroform führen zu den gleichen Ergebnissen.

Zur Überprüfung dieser Befunde untersuchte ich das Verhalten des Bestrahlungsproduktes im elektrischen Feld bei verschiedenen pH-Werten. Nähere Angaben hierüber sind bereits unter „Material und Methodik“ gemacht worden.

Es sollte einmal festgestellt werden, wieweit sich die Papierelektrophorese für quantitative Messungen bei Farbstoffanalysen verwenden läßt. Ganz allgemein ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Feldstärke proportional, sie ist von dem Charakter und der Zahl der Ladungen eines Ions, dessen Größe und Molekülform abhängig (*Musso* 1958). Aus der Größe der Wanderung lassen sich Rückschlüsse auf die Ladungs- und Dissoziationsverhältnisse ziehen. Auf diese Weise konnten z. B. die isoelektrischen Punkte von Proteinen usw. bestimmt werden (Literatur bei *Wunderly* 1954). Dort finden sich auch weitere Angaben über die Unter-

schiede zwischen freier Elektrophorese und Papierelektrophorese, über den Einfluß von elektroosmotischen Kräften, Temperaturschwankungen, verschiedenen Papiersorten und deren unterschiedlichen Eigenladungen, die Bedeutung der Salzkonzentration der Pufferlösungen usw., worauf hier nur hingewiesen werden kann).

Während im Chromatogramm (Drawert und Metzner 1956, S. 374, Abb. 3 a) mit Aceton-Wasser (4:6) keine weitere Auftrennung des sauren Farbstoffes zu bemerken ist, findet im elektrischen Feld eine

Tab. 1. Ausschüttelungsversuche mit der anionischen Komponente einer bestrahlten Neutralrotlösung und Benzol bei verschiedenen pH-Werten der wässerigen Phase.

Farb- puffer pH	Wäßrige Lösung		Verteilung zwischen			
	Eigenfarbe	Fluoreszenz- intensität	hydrophiler Phase		lipophiler Phase	
			Eigenfarbe	Fluoreszenz- intensität	Eigenfarbe	Fluoreszenz- intensität
n-HCl						
1,5		—	rot	—	schwach	++++
2,5		+		+	gelblich	++++
3,5		++		++		++++
4,6		+++		+++		+++
5,9	↓ ↑	++++	↓ ↑	++++		+ (+)
6,4		++++		++++	↓	+
6,8		++++		++++	farblos	(+)
8,8		++++		++++		—
10,1		+++		+++		—
12,1		+++		+++		—
n-KOH	gelb	++	gelb	++		—

deutliche Trennung in sechs verschiedene Anteile statt (Abb. 2). Gelegentlich läßt sich in alkalischen Pufferlösungen noch eine schwache siebente Komponente unterscheiden. Über die unterschiedliche Wanderung gibt Abb. 3 Auskunft.

Zur Auswertung werden die Wanderungsstrecken der einzelnen Komponenten pro Stunde berechnet und gegen den pH-Wert der Pufferlösung aufgetragen. Die einzelnen Meßpunkte sind Mittelwerte aus 5 bis 10 Einzelmessungen. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist konzentrationsabhängig, wobei eine Erhöhung der aufgetragenen Farbstoffmenge eine schnellere Wanderung bedingt. Bei gleichen Konzentrationen kann eine befriedigende Übereinstimmung erzielt werden. Gerade bei der Untersuchung saurer Farbstoffe, die meist wesentlich schneller wandern als basische, ist zu beachten, daß die Besprühung des Papierstreifens mit der Pufferlösung völlig gleichmäßig durchgeführt wird. In den beiden Pufferkammern muß unbedingt Niveaugleichheit herrschen, weil es sonst durch Heberwirkung zu unkontrollierbaren Verschiebungen kommt. Im Tageslicht sind die einzelnen Farbflecke nur ganz schwach zu erkennen; unter der Quarzlampe zeigen sie grünliche Fluoreszenzen unterschiedlicher Intensität und Farbtonung. Eine nähere Bezeichnung anzuführen, hätte hier wenig Sinn, da die Fluoreszenzfarbe konzentrationsabhängig ist. Die dritte Komponente zeichnet sich durch gelbe Eigenfärbung und eine intensive Gelbfluoreszenz aus.

Die Elektrophoreseversuche zeigen, daß aus der in Toluol gelösten Neutralrotbase durch die Einwirkung des kurzwelligen Lichtes mindestens sechs verschiedene negativ geladene Komponenten entstehen, die sich in ihrem Wanderungsvermögen und damit auch in ihren Ladungseigenschaften beträchtlich unterscheiden.

Die wiedergegebenen Kurven der sechs Komponenten lassen sich aus den schon dargelegten Gründen nicht ohne weiteres miteinander vergleichen, da der chemische Aufbau der verschiedenen Bestrahlungsprodukte unbekannt ist. Der Anstieg der einzel-

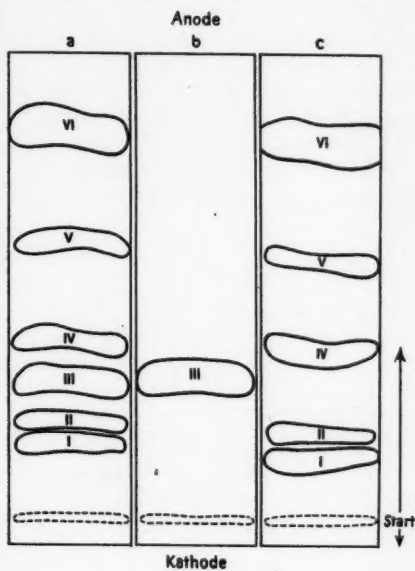


Abb. 2.

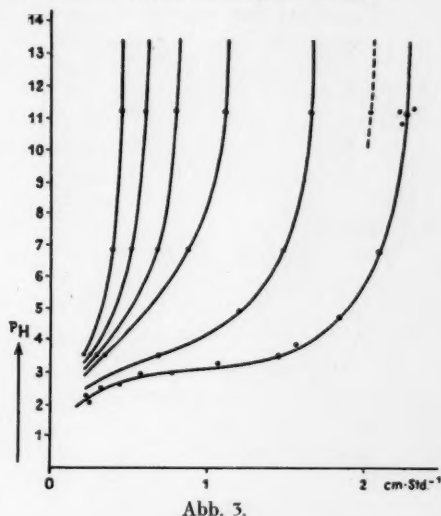


Abb. 3.

Abb. 2. Papierelektrophoretische Trennung der anionischen Komponenten, die bei der Bestrahlung einer Neutralrotlösung (Farbbase) in Toluol entstehen. a = Stammlösung A, b = lipophile Komponente, c = ausgeschüttelte Restlösung. (Phosphatpuffer pH 11,1; Laufzeit 5 Stunden.)

Abb. 3. Die unterschiedliche elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit der in Abb. 2 dargestellten anionischen Komponenten I bis VI (--- eine nicht immer zu beobachtende, bei stark alkalischer Reaktion auftretende schwache 7. Komponente).

nen Kurven in Abhängigkeit vom pH-Wert der Pufferlösung dürfte aber wenigstens einen Hinweis auf das Dissoziationsverhalten des Stoffes geben.

Nachdem elektrophoretisch nachgewiesen wurde, daß das Bestrahlungsprodukt nicht einheitlich ist, erhebt sich sofort die Frage, welche der hier aufgezeigten Komponenten für die vitale Plasmafärbung pflanzlicher Zellen verantwortlich ist. Aus den geringen Farbunterschieden ergaben sich rein visuell keine Anhaltspunkte, eine weitere chromatographische Auftrennung mit verschiedenen Lösungsmittelsystemen gelang nicht.

Im Anschluß an die Ausschüttelungsversuche mußte nach lipoidlöslichen Anteilen gesucht werden. Dazu wurde die gewonnene „Stammlösung A“ (1 : 1000) stark angesäuert und mit Benzol wiederholt durchgeschüttelt, bis dieses keine Fluoreszenz mehr aufwies. In Benzol lösen sich noch geringe Wassermengen (in 100 ml 2,11 ml  $H_2O$  bei 20°); es war nötig, dieses mit wasserfreiem Kupfersulfat zu entfernen, um so alle lipoidunlöslichen sauren Komponenten auszuschalten. Äther eignet sich wegen des relativ hohen Wassergehaltes nicht zur Extraktion. Das eingeeengte Benzol hat eine schwach gelbliche Farbe und fluoresziert intensiv gelbgrün. Durch Überführung in doppelt destilliertes Wasser und Vertreibung der organischen Phase ließ sich eine rein gelbe Lösung gewinnen, die auch unter der Analysenlampe reingelb aufleuchtet. Zur Feststellung, um welche von den sechs Komponenten es sich hier handelt, wurden die Stammlösung, der lipoidlösliche Farbstoff und die neutralisierte unlösliche Restlösung elektrophoretisch verglichen. Abb. 2 a, b, c zeigt eindeutig die Identität der „lipoidlöslichen“ mit der gelbfluoreszierenden Komponente III.

Die Ergebnisse bei der vitalen Anfärbung von Zwiebelzellen stimmen mit den bereits geschilderten (S. 524) überein. Durch die erhöhte Konzentration ist die Cytoplasma- und Kernfärbung noch verstärkt. Im Ausschüttelungsversuch mit Benzol zeigt dieses eine gerade noch wahrnehmbare Fluoreszenz bei pH 6,3.

#### e) *Strahlenwirkung auf die sauren Komponenten*

Wie schon erwähnt worden ist, verblaßt während der mikroskopischen Beobachtung die gelbe Plasmafluoreszenz — in Abhängigkeit von der Dauer der Färbezeit und der verwendeten Konzentration — recht bald. Ein völliges Verlöschen wird selten beobachtet, auch nach längerer Bestrahlungszeit fluoresziert das Plasma noch schwach grünlich. Hier kann aber bereits eine Strahlenschädigung vorliegen (Drawert 1952). Eine Bestrahlung der in Toluol gelösten Komponente für 30 Minuten mit der Quecksilberhöchstdrucklampe vernichtet die gelbe Eigenfarbe völlig, eine Fluoreszenz ist nur noch ganz schwach zu erkennen.

In der Literatur ist die Erscheinung der Fluoreszenzlöschung durch UV-Strahlen bei den verschiedensten Stoffen beschrieben worden. Dabei ist die Größe des Fluoreszenzabfalles sehr von dem verwendeten Lösungsmittel abhängig. Krieger und Herforth (1957) finden beim Benzopyren eine stärkere Löschung in Aceton gegenüber Benzol bei gleicher Strahlendosis. v. Brand (1955) beschreibt eine völlige Fluoreszenzlöschung einer Methylcholanthrenlösung in Benzol. Unter den Bedingungen der angewandten Strahlung soll dabei aus Benzol Chinon entstehen, das für den Bestrahlungseffekt verantwortlich gemacht wird. Direkte Zugabe von Chinon führt ebenfalls zu einer Fluoreszenzlöschung.

Zur Kontrolle wurden auch Bestrahlungen in wäßrigen Lösungen durchgeführt. Das Ergebnis ist das gleiche. Sowohl im dissoziierten Zustand (alkalische Lösung) als auch im sauren Milieu wird der Farbstoff weiter zerstört. Ebenso wie die lipophile Komponente ist die nicht lipoidlösliche Restlösung strahlenempfindlich, wenn vielleicht auch nicht in dem Maße wie der gelbe Farbstoff. Hierüber könnten nur genaue quantitative Messungen Auskunft geben.

Zusammenfassend läßt sich bis jetzt sagen, daß durch die Einwirkung energiereicher UV-Strahlen auf die gelöste Neutralrotbase negativ geladene, gelblichgrün gefärbte und ebenso fluoreszierende Zwischenprodukte entstehen, die wiederum im gleichen Licht in farblose Substanzen übergehen. Die zunächst im Elektrophoreseversuch nachgewiesenen sechs Verbindungen treten bereits nach zwei Sekunden Bestrahlung auf.

Wichtig wäre die Kenntnis der jeweils wirksamen Wellenlängenbereiche für die Bildung und für die Zerstörung der sauren Komponenten. Hierzu müßten genaue Absorptionsmessungen durchgeführt werden. Eine weitere präparative Auftrennung würde aber über den Rahmen dieser Untersuchungen hinausführen. Die Verwendung einer Hochspannungselektrophorese-Apparatur mit kontinuierlicher Arbeitsweise führte zu keinen Erfolgen.

#### f) Die Art der photochemischen Reaktion. Der Einfluß des Lösungsmittels

In allgemeinchemischer Hinsicht ist die Frage interessant, welche Veränderungen durch die energiereichen Strahlen am Neutralrotmolekül hervorgerufen werden. Beim Neutralrotmolekül ist die Entstehung einer dissoziierfähigen sauren Gruppe eigentlich nur durch die Anlagerung von Sauerstoff denkbar.

Die photooxydative Zerstörung von Farbstoffen ist vielfach eingehend untersucht worden, da die Erscheinung des Ausbleichens von gefärbten Gegenständen von großer Bedeutung für die Praxis ist. Nach den Untersuchungen von Gebhard (1911, weitere Literatur bei Bachér 1929) werden dabei durch Anlagerung von Sauerstoff oder auch Wasser (Bedeutung der Luftfeuchtigkeit für das Ausbleichen, vgl. Rein 1934) an die im Licht aktivierten Gruppen Farbstoffperoxyde, Peroxyhydrate oder Phenole gebildet, die mehr oder weniger beständig sein können, meist aber zu ungefärbten Verbindungen mit saurem Charakter abgebaut werden.

Zum Nachweis eines Sauerstoffeinflusses auf Neutralrot wurde die in Toluol gelöste Base mit Stickstoff desoxygeniert und unter Luftabschluß bestrahlt. Normalerweise deutet schon nach 5 bis 10 Minuten eine Rotfärbung den Beginn der Niederschlagsbildung an; hier war auch nach einstündiger Einwirkung keinerlei Veränderung zu beobachten. Zur Kontrolle bestrahlte ich eine wäßrige, schwach gepufferte Lösung nach Vertreibung des Sauerstoffes; die Flüssigkeit blieb völlig klar und zeigte keinerlei Farbveränderung im ultravioletten Licht. Eine gleiche Lösung, durch die während der Lichteinwirkung ein reiner Sauerstoffstrom geleitet wurde, ließ die Entstehung eines feinen Niederschlages erkennen (keine Base!) und fluoreszierte gelborange. Papierchromatographische und elektrophoretische Versuche bestätigten die Ergebnisse.

Die Veränderungen der Neutralrotbase durch kurzwellige Strahlen zu anionischen, grün fluoreszierenden Verbindungen erfolgt nur in Gegenwart von freiem Sauerstoff, in völlig desoxygenierter Lösung tritt keine Reaktion ein. Es handelt sich also um einen photooxydativen Vorgang.

Beim intensiven Belichten eines organischen Lösungsmittels ist zu beachten, wie weit dieses selbst durch die Strahlen verändert wird. Aus der chemischen Literatur (Angaben bei Bachér 1929) geht hervor, daß die zyklischen Kohlenwasserstoffe vom Licht in Gegenwart von Sauerstoff leichter angegriffen werden als die Paraffinabkömmlinge. Die Einwirkung erfolgt hier in der Seitenkette, eine oxydative Spaltung des Benzolringes ist auf diese Weise nicht zu erreichen.

1. Toluol wird nach Ciamician und Silber (1912) durch Sonnenbestrahlung zu Benzoesäure oxydiert, außerdem treten Benzaldehyd und Ameisensäure auf. Kailan (1920) bestrahlte Toluol mit der Quecksilberlampe in Gegenwart von Wasser. Nach ungefähr 50 Stunden beobachtete er die Bildung von Benzoesäure, Ameisensäure und Oxalsäure im gegenseitigen Mengenverhältnis von 44 : 36 : 20. Zur informativischen Überprüfung, wie weit bei einer kurzfristigen Einwirkung Zersetzungsprodukte auftreten, setzte ich für 1 Stunde wassergesättigtes Toluol dem Licht der Quecksilberhöchstdrucklampe aus. Nach Durchschüttelung mit destilliertem Wasser ließen sich in diesem reduzierende Substanzen durch Ausscheidung von metallischem Silber aus einer ammoniakalischen Silbernitratlösung in der Wärme und Entfärbung einer Kaliumpermanganatlösung nachweisen. Eine Prüfung auf Oxalsäure verlief negativ. Die Proben zeigen, daß auch bei meinen Versuchen mit einer Veränderung des Toluols zu rechnen ist.

Um Fehlschlüsse durch eine mögliche Reaktion der Lösungsmittel-Zersetzungsprodukte zu vermeiden, bestrahlte ich die Neutralrotbase noch in folgenden anderen Reagenzien. Einige Literaturangaben über das Verhalten der Stoffe im kurzwelligen Licht mögen hier mit angeführt werden.

2. Reines Benzol ist verhältnismäßig beständig (Suida 1912; Ciamician 1913), weil substituierte Gruppen fehlen, obwohl es eine starke UV-Absorption besitzt. v. Brand (1955) konnte unter ihren Versuchsbedingungen eine Umwandlung zum Chinon nachweisen. Für meine Untersuchungen ist der niedrige Siedepunkt ungünstig, vorgeschaltete Kühlküvetten würden die Strahlenintensität herabsetzen. Die Niederschlagsbildung der sauren Produkte erfolgt wie beim Toluol.

3. Xylol: Substituierte Benzolabkömmlinge werden im Licht zu den entsprechenden Säuren oxydiert (Ciamician und Silber 1912). Die Reaktionsfähigkeit nimmt mit steigender Zahl der Seitenketten zu, was besonders für paraständige Methylgruppen zutrifft. Hier ist noch zu erwähnen, daß p-Xylol und auch Toluol autoxydable Stoffe sind, die bei Lichteinwirkung mit dem Sauerstoff der Luft reagieren können und auch befähigt sind, aktivierten Sauerstoff auf andere Körper zu übertragen, die an sich im Licht beständig sind. Es muß also damit gerechnet werden, daß das organische Lösungsmittel auch als Sensibilisator auf den Farbstoff einwirken kann.

4. Paraffinum liquidum: Paraffinkohlenwasserstoffe sind im Licht wesentlich reaktionsträger, soweit es sich um gesättigte Formen handelt. Grün und Wirth (1920) konnten z. B. bei 3 bis 5½ stündiger UV-Einwirkung auf Paraffin (Schmp. 52°) bei 160° keine Beschleunigung der Zersetzung feststellen. Zur besseren Durchschüttelung mit einer Neutralrotlösung und anschließenden Phasentrennung mußte bei meinen Untersuchungen etwas erwärmt werden.

5. Äthylalkohol besitzt nur schwach lipophile Eigenschaften. Durch die Einwirkung des UV-Lichtes kann eine Reduktion zum Aldehyd eintreten. Neutralrot wird mit rotem Farbton und roter Fluoreszenz gelöst. Nach Zugabe von einigen Tropfen KOH schlägt die Farbe nach Gelb um (UV: rein orange). Die Base fällt dabei nicht aus. Während der Bestrahlung färbt sich die Lösung wieder rot, eine Niederschlagsbildung tritt aber nicht ein.



6. Glycerin wird in wäßriger Lösung (10%) durch das Licht einer Quecksilberlampe rasch zersetzt unter Bildung von Formaldehyd und undefinierten Säuren. Das Reaktionsprodukt reduziert Fehlingsche Lösung in der Kälte (Bierry, Henri und Ranc 1910, 1911). Die Neutralrotbase ist in verdünntem Glycerin noch recht gut löslich.

Ein elektrophoretischer Vergleich der aus den verschiedenen Medien gewonnenen sauren Produkte zeigt Übereinstimmung mit Abb. 2 a. Da nicht anzunehmen ist, daß aus allen benutzten aliphatischen und zyklischen Verbindungen unter der Strahlenwirkung die gleichen Zersetzungsprodukte entstehen, dürfte damit der Beweis erbracht sein, daß die grün fluoreszierenden Komponenten reine Abkömmlinge des Neutralrotmoleküls sind.

Zum Vergleich muß noch das Verhalten einer wäßrigen Neutralrotlösung untersucht werden. Wie schon erwähnt wurde, ist die Ausbeute hier sehr gering, weil einerseits der Anteil der gelöst vorliegenden Base klein ist und andererseits die sauren Zwischenprodukte selbst wieder im kurzwelligen Licht zersetzt werden. Durch Verwendung einer größeren Küvette, wo nur etwa ein Viertel der Fläche von den Strahlen getroffen wird, kann der weitere Abbau z. T. vermieden werden. Ein Sauerstoffstrom sorgt während der Bestrahlung für gute Durchmischung, so daß sich die Spaltprodukte im verdunkelten Teil des Gefäßes anreichern können. Die mit Hilfe von Zellulosepulver gereinigte „Stammlösung B“ zeigt bei der Papierelektrophorese ein abweichendes Bild (Abb. 4).

Wegen der geringen Konzentration ist selbst die Analyse unter der Quarzlampe nicht immer eindeutig. Es lassen sich nur vier verschiedene Komponenten trennen, die in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit nicht mit den oben beschriebenen übereinstimmen. Die Erscheinung ist insofern interessant und kann von Bedeutung für die Analyse der Vitalfärbung sein, da in der Zelle ebenfalls verschiedene Speicherorte vorliegen (Plasma-Vakuole) und wir über den Zustand des Farbstoffes in der Vakuole nichts Genaues aussagen können. Bei den Modell-

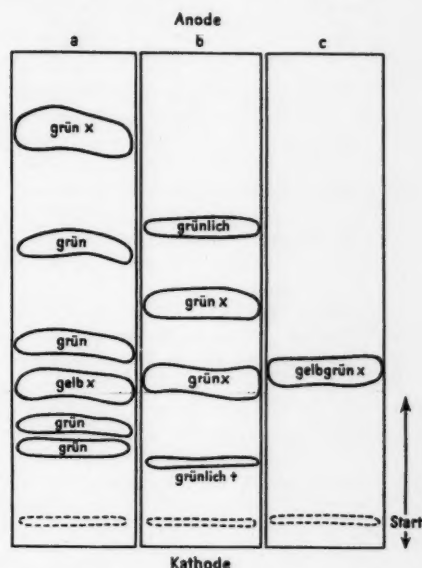


Abb. 4. Elektrophoretischer Vergleich der anionischen Komponenten, die bei der Bestrahlung einer Lösung der Neutralrotbase in Toluol (Stammlösung A = a) und einer wäßrigen Neutralrotlösung (Stammlösung B = b) entstehen. c = lipophiler Anteil der Stammlösung B. (Farbtonanalyse im UV; x = intensiv fluoreszierend; + = im Tageslicht ganz schwach rötlich.)



versuchen muß noch die unterschiedliche Sauerstoffspannung im Wasser und in den organischen Medien beachtet werden, wodurch weitere Zersetzungen der primär gebildeten Komponenten verhindert oder beschleunigt werden. Die Löslichkeit von Gasen in organischen Flüssigkeiten ist bei Erwärmung vielfach erhöht, während sie in Wasser rasch absinkt. Bei den hohen, während der Bestrahlung auftretenden Temperaturen wird trotz des durchgeleiteten Sauerstoffstromes die gelöste Gasmenge nur gering sein, was eine schwächere Reaktion zur Folge hat. So ist auffallend, daß bei belichteten wäßrigen Lösungen eine negativ geladene Komponente nach der elektrophoretischen Trennung noch einen rötlichen Farbton zeigt (Abb. 4 b).

Ein Faktor, der für die Deutung der Elektrophoreseversuche in diesem Falle von Ausschlag sein kann, ist die Anwesenheit von nicht unbeträchtlichen Mengen Chlorionen in der bestrahlten Lösung.

Für die Stammlösung A (Bestrahlung in Toluol) wurde ein pH-Wert von etwa 6,4 ermittelt. Die Lösung B (Bestrahlung in  $H_2O$ ) zeigt einen höheren Säuregrad (pH 4–5). Die Ursache hierfür ist einmal in den verschiedenen Ausgangsmaterialien zu sehen, andererseits in der Eigenschaft der Zellulose, als Kationenaustauscher zu wirken. Wenn man z. B. eine neutrale Salzlösung durch Zellulosepulver schickt, so wird sie sauer, da die Metallionen in gewissem Grade gegen Wasserstoffionen ausgetauscht werden.

Während die Stammlösung A aus der reinen Neutralrotbase hergestellt wurde, die Chlorionen durch die Ausschüttelung mit organischen Medien also ausgeschieden werden konnten, läßt sich in der B-Lösung nach der Reinigung durch die Zellulosesäule eine größere Menge Chlorid nachweisen. Dies ist besonders deutlich, wenn die Lösung wegen der geringen Konzentration an sauren Zersetzungsprodukten stark eingengt wird, wie es für die Elektrophoreseversuche notwendig ist. Die Stammlösung B hat ebenfalls eine gelbbraunliche Farbe, die bei Ansäuerung nach rot umschlägt, wobei gleichzeitig ein Verlust der gelbgrünen Fluoreszenz zu beobachten ist. Sie enthält auch einen lipidlöslichen Anteil (Abb. 4 c), mit dem sich vitale Plasma- und Kernfärbungen durchführen lassen.

#### *g) Nachweis der hydrophoben Komponente*

Bisher wurde nur nach sauren Oxydationsprodukten gesucht. Bei der Bestrahlung im Modellversuch fielen diese mit noch unveränderten Neutralrotanteilen vermengt aus den lipophilen organischen Lösungsmitteln aus und konnten deshalb leicht abzentrifugiert werden. Der Niederschlag ließ sich fast völlig in heißem Alkohol lösen, der zur weiteren säulenchromatographischen Reinigung der sauren Komponenten wieder entfernt werden mußte. Dies geschah durch Überführung in Wasser und Erhitzen der Lösung. Bei der Verdrängung des Alkohols zeigte sich von neuem eine geringe Ausfällung (vgl. S. 522), die in abs. Alkohol, Aceton, Benzol, Toluol u. a. mit gelber Farbe und grünlichgelber bis reingelber Fluoreszenz gelöst werden kann, aber nicht in verdünntem Alkohol oder Wasser. Es handelt sich also hier um eine extrem lipophile Substanz, die auch nicht mit der Neutralrotbase identisch ist. Im elektrischen Feld wird nach 36 Stunden keinerlei Verschiebung des orange fluoreszierenden Fleckes festgestellt.

Mit diesen Befunden kann auch eine Angabe von Drawert und Metzner (1956, S. 375) erklärt werden. Bei der Beschreibung ihrer Elek-

trophoreseversuche zur Feststellung der Ladungseigenschaften der entdeckten grün fluoreszierenden Bestrahlungskomponente wird erwähnt, daß der am Start liegenbleibende Fleck bis weit ins saure Gebiet intensiv orange fluoresziert. Im neutralen und schwach sauren pH-Bereich wird diese Fluoreszenz durch das am Papier adsorbierte, nur langsam wandernde Neutralrot-Kation oder die Farbbase hervorgerufen, aber nicht bei weiterer Ansäuerung. Das deutet darauf hin, daß es sich auch hier um die „hydrophobe Komponente“ handelt.

Zum Nachweis dieser Verbindung möchte ich noch folgende Versuche anführen:

1. Die Neutralrotbase wird in Toluol bestrahlt, dieses anschließend wiederholt mit verdünnter Salzsäure durchgeschüttelt, um den unveränderten Farbstoff zusammen mit den nicht lipophilen Anteilen aus der organischen Phase herauszulösen. Bei einer anschließenden Behandlung des Toluols mit verdünnter Kalilauge muß die „lipoidlösliche Komponente“, entsprechend den Ausschüttelungsversuchen (S. 526), in die wäßrige Lösung übergeben.

Nach Auswaschen mit destilliertem Wasser behält das Toluol seine gelbliche Farbe und zeigt unter der Quarzlampe eine grünlichgelbe Fluoreszenz.

2. Neutralrot 1 : 2000 wird in schwach gepufferter wäßriger Lösung bestrahlt. Durch die Erwärmung ist eine verstärkte Ausfällung der schwerlöslichen Base zu beobachten, die sich durch Zusatz von einigen Tropfen Salzsäure wieder beseitigen läßt. Trotzdem bleibt ein feiner Niederschlag noch erhalten, der in einem Filter aufgefangen, mit Salzsäure gewaschen und dann getrocknet wird. In Benzol ist er mit gelber Farbe löslich.

Beim Bestrahlen von Neutralrot sowohl in wäßrigen als auch in lipophilen organischen Lösungsmitteln kann die Bildung einer rein hydrophoben Komponente nachgewiesen werden, die sich in wäßrigen Medien nicht lösen läßt. Wieweit sie auch in vitalgefärbten Pflanzenzellen bei den relativ kurzen Beobachtungs- und damit Einwirkungszeiten in Erscheinung tritt, kann nicht entschieden werden, da die Fluoreszenzfarbe kaum von denen der anderen sauren Zersetzungsprodukte abweicht.

#### *h) Besprechung der Ergebnisse, Schlußfolgerungen auf den Aufnahmemechanismus von Neutralrot, Akridinorange und Thionin*

Werden Zwiebelepidermen, deren Vakuolen mit Neutralrot zinnborerrot gefärbt sind, im Fluoreszenzmikroskop längere Zeit beobachtet, so beginnen die zuerst dunkel erscheinenden Zellsafträume nach und nach grün bis gelbgrün zu fluoreszieren (Strugger 1940). Als Ursache dieser Fluoreszenzerscheinung konnte von Drawert und Metzner (1956) eine Veränderung des Farbstoffes nachgewiesen werden. Unter der Einwirkung des kurzwelligen Lichtes entsteht aus dem kationischen Neutralrot ein grün fluoreszierender negativ geladener Körper.

Die durchgeführten Untersuchungen bestätigten die Befunde von Drawert und Metzner (1956), daß Neutralrot unter der Einwirkung von UV- oder Blaulicht eine chemische Veränderung erfährt. Es konnte gezeigt werden, daß dabei mindestens sieben verschiedene Komponenten entstehen, die sich teilweise auf Grund ihrer spezifischen Lipoidlöslichkeit leicht trennen lassen.

Bei den Untersuchungen zeigte sich auch, daß nur die ungeladenen Neutralrotbasenmoleküle, nicht aber die dissoziierten Farbstoffkationen strahlenempfindlich sind. Ferner erfolgt eine Umwandlung des Farbstoffes nur bei Anwesenheit von molekularem Sauerstoff; unter einer Stickstoffatmosphäre ist keine Veränderung festzustellen. Es handelt sich also um eine photooxydative Zerstörung des Basenmoleküls.

Die grün fluoreszierenden Zersetzungsprodukte lassen sich nach ihrem Lösungsvermögen in eine rein „hydrophobe Komponente“, einen in saurem Milieu „lipoidlöslichen“ Anteil und mehrere rein hydrophile Stoffe einteilen. Beachtenswert ist, daß man beim Bestrahlen von alkalisch gepufferten wäßrigen Neutralrotlösungen Produkte nachweisen kann, die sich im elektrischen Feld abweichend verhalten. Die unterschiedliche Sauerstoffspannung in wäßrigen und organischen Medien mag dafür mitbestimmend sein, da die primär gebildeten Komponenten im kurzwelligen Licht bei Sauerstoffgegenwart leicht weiter zu farblosen Verbindungen abgebaut werden. Die „hydrophobe Komponente“ läßt sich bei einer Strahleneinwirkung sowohl auf wäßrige als auch auf organische Lösungen nachweisen, desgleichen entsteht in beiden Fällen ein im sauren pH-Bereich lipoidlöslicher Anteil.

Es ist schon darauf hingewiesen worden, daß der Nachweis von je nach dem Charakter des Lösungsmittels verschiedenen Zersetzungsprodukten auch für die Deutung der bei Vitalfärbung gemachten Beobachtungen wichtig sein kann, da in der Zelle ebenfalls unterschiedliche Speicherorte für den Farbstoff vorliegen.

Wie meist angenommen wird (Drawert 1940, 1948, 1956; Strugger 1940, 1949; vgl. auch Höfler 1947, 1948, 1949), beruht die Fluorochromierung des Plasmas bei einer Neutralrotfärbung auf einer Anreicherung der undissoziierten Farbbase in lipoiden Phasen des Protoplasten. Die Fluoreszenz entspricht einer in neutralen hydrophoben Medien ausgeschüttelten Neutralrotlösung.

Bei der Bestrahlung von neutralrothaltigem Toluol oder Benzol erfolgt sehr bald ein Farbumschlag von Gelb nach Rot, der die Ausfällung der sauren Produkte anzeigt. Dabei ist gleichzeitig in dem Maße, wie die Basenmoleküle zerstört werden, eine erhebliche Fluoreszenzverminderung festzustellen.

Die Plasmafluoreszenz nimmt während der mikroskopischen Beobachtung dagegen nicht ab, sondern wird durch die Strahleneinwirkung sogar zuerst noch verstärkt (Drawert und Metzner 1956). Beim Bestrahlen einer gefärbten Benzol- oder Toluollösung in der Küvette, auch beim Beobachten eines Tropfens auf dem Objektträger oder eines Toluol-Gelatine-Modells (S. 548), ist dieser Effekt nicht nachzuweisen. Eine begründete Erklärung für die Fluoreszenzverstärkung lebender Protoplasten kann noch nicht gegeben werden. Erst nach sehr langen Einwirkungszeiten von 30 bis 60 Minuten tritt die Plasmafluoreszenz zurück, während die Vakuole unvermindert gelb aufleuchtet. Zu diesem Zeitpunkt zeigt das Plasma aber schon eine starke Schädigung, wie die Rotfärbung besonders der Plasmazwiel im Hellfeld zu erkennen gibt.

Im Modellversuch werden die grün fluoreszierenden Zwischenprodukte bei weiterer Bestrahlung bis zu farb- und fluoreszenzlosen Verbindungen abgebaut. Bei der Beobachtung von angefärbten Zwiebel-Oberepidermiszellen wird jedoch kein Nachlassen der sekundären Vakuolenfluoreszenz bemerkt. Dies ist auch nicht zu erwarten, da infolge des großen Speichervermögens der Zelle stets neue Basenmoleküle zur Verfügung stehen dürften. Außerdem wird im Innern der Zelle die Strahlenintensität durch die Membran — hier besonders durch Wachs- und Kutinschichten (Wuhrmann-Meyer 1941) — und durch das Plasma wesentlich abgeschwächt sein (Glubrecht 1956), so daß innerhalb nicht letaler Einwirkungs- und Beobachtungszeiten auch keine völlige Zerstörung des aufgenommenen Neutralrots stattfindet. Drawert und Metzner (1956) zeigten, daß auch bei einer reinen Membranfärbung an *Allium*-OE-Zellen in sauren Farbpuffern (pH 3–4) eine grünliche Vakuolenfluoreszenz durch die Strahleneinwirkung ausgelöst wird. Diese wichtige Beobachtung kann bestätigt werden. Auf Grund der intensiven Fluoreszenz der sauren Zersetzungsprodukte ist somit durch die Bestrahlung ein Mittel gegeben, auch geringste Konzentrationen an frei gelösten Basenmolekülen nachzuweisen. Allerdings müssen wir dabei beachten, daß möglicherweise auch saure, hydrophile Komponenten erst sekundär aus dem Plasma in die Vakuole ausgeschieden werden. Das Auftreten der grünen Zellsaftfluoreszenz ist immer erst geraume Zeit später zu beobachten, nachdem das Plasma schon die intensive gelbgrüne Fluoreszenz angenommen hat. Ein Übertritt hängt von der Durchlässigkeit der inneren Plasmagrenzschicht ab. Bei den „vollen“ Unterepidermiszellen der Zwiebel, die den Farbstoff wahrscheinlich in gebundener, also für UV-Strahlen wohl nur schwer angreifbarer Form speichern (Kinzel 1958), wird aber keine sekundäre Zellsaftfluoreszenz beobachtet (Toth 1952), obwohl eine Fluoreszenzverstärkung des Plasmas (Drawert und Metzner 1956) auch hier auf eine Strahlenreaktion schließen läßt.

Es erschien reizvoll, das weitere Verhalten der gebildeten anionischen Komponenten in der Zelle zu verfolgen. Obwohl die Veränderung des Farbstoffes sehr schnell erfolgt, die Strahleneinwirkung also nur kurzfristig ist, macht sich doch nach einiger Zeit eine starke Schädigung der Zellen bemerkbar. Werden die Zellen dagegen im ungefärbten Zustand bestrahlt, so erweisen sie sich auch nach relativ langer Einwirkungszeit als sehr resistent. Bei den gefärbten Zellen ist deshalb auch mit einem „photodynamischen Effekt“ des belichteten Farbstoffes zu rechnen. Zum anderen können auch die gebildeten sauren Produkte einen schädigenden Einfluß ausüben, etwa in dem Sinne, daß im Vergleich zu den Modellversuchen in den lipoiden Phasen des Plasmas Ausfällungen auftreten.

Werden die in alkalischem Puffer gefärbten und bestrahlten Objekte in ein saures Medium übertragen, so wandert in der bekannten Weise der unveränderte Farbstoff aus der Vakuole und dem Plasma aus und wird in der Membran festgelegt. Die gelbe Fluoreszenz der Vakuole bleibt erhalten, auch das Plasma wird nicht völlig entfärbt (lipophile Zersetzungs-komponenten?). Aber dieser Eingriff, der bei einer unbestrahlten Zelle

leicht durchgeführt werden kann, erweist sich hier als so stark schädigend, daß keine Gewähr für die volle Vitalität der Zelle mehr gegeben ist.

Die Verhältnisse bei den „leeren“ Oberepidermiszellen ermöglichen in Verbindung mit der Feststellung, daß nur Basenmoleküle zu grün fluoreszierenden Verbindungen abgebaut werden, einige allgemeine Betrachtungen über den Aufnahme-prozeß basischer Vitalfarbstoffe anzuschließen.

Durch die obigen Befunde wird die Annahme Struggers (1940) unterstützt, daß auch aus sauren Lösungen der Farbstoff in geringem Maße von der Zelle aufgenommen wird. In der Vakuole müßte dann das Neutralrot aber wenigstens teilweise als ungeladenes Molekül vorliegen und einem der Wasserstoffionenkonzentration entsprechenden Dissoziationsgleichgewicht zufolge stets neues, für Strahlen angreifbares Material zur Verfügung stehen.

Nach mikrospektrographischen Messungen von Bartels und Schwantes (1957) ist bei Zwiebel-OE-Zellen eine Farbstoffaufnahme in die Vakuole von pH 5,0 an nachweisbar. Der Speicherungsgrad in Abhängigkeit von der Azidität der gebotenen Farblösung weist deutlich einen stufenförmigen Verlauf auf. Die Autoren vergleichen die Neutralrotaufnahme mit dem Anteil der bei den entsprechenden pH-Werten vorliegenden Basenmoleküle und diskutieren neben einem rein osmotischen Aufnahme-prozeß in starkem Maße die Beteiligung nichtosmotischer und metaosmotischer Vorgänge im Sinne von Bogen und Prell (1953) für die beiden prototropen Formen des einfach positiv geladenen Neutralrotkations. Dafür spricht (S. 9), „daß die gemessene Stufe mit dem Existenzbereich des Molekülkions  $\text{NR}^+_{\text{I}}$  zusammenfällt, und zum anderen, daß der Kurvenabschnitt im Alkalischen mit der Konzentration undissoziierter Moleküle eine gute Übereinstimmung zeigt, ferner jedoch auch in gewisser Weise die verschiedene Zeitabhängigkeit der Farbstoffaufnahme bei pH 6,75 und pH 9,6. Die Farbstoffaufnahme bei pH 6,75 erfolgt nicht so viel langsamer, wie es die bei diesem pH-Wert wesentlich geringere Außenkonzentration undissoziierter NR-Moleküle erwarten lassen sollte.“

Wie die Abb. 2 und 5 der genannten Arbeit zeigen, sinkt der Anteil an ungeladenen Basenmolekülen in Pufferlösungen zwischen pH 8 und 6,5 rasch ab. Damit ist aber keineswegs gesagt, daß nicht auch aus Lösungen höherer Azidität Neutralrot-Moleküle in geringer Menge ins Plasma und in die Vakuole aufgenommen werden. So berichten Drawert und Metzner (1956) von einer orangegelben Plasmafluoreszenz bei pH 5, während im Hellfeld nur eine reine Membranfärbung zu beobachten ist. Die Tatsache, daß man auch bei niedrigen pH-Werten der Außenlösung durch kurzweilige Strahlen eine sekundäre Vakuolenfluoreszenz erzielen kann, spricht ebenfalls gegen die Annahme einer Kationenpermeabilität; man müßte sonst fordern, daß die in die Zelle gelangten Neutralrotkationen in der Vakuole wieder zu undissoziierten Molekülen zusammentreten.

Im Ausschüttelungsversuch mit Benzol oder Toluol läßt sich aber gleichfalls eine Fluoreszenz der organischen Phase auch noch bei starker saurer Reaktion der wäßrigen Phase beobachten. Der Grad der Lipidlöslichkeit eines Farbstoffes braucht nicht in direktem Zusammenhang mit dem Verlauf

seiner Dissoziationskurve bzw. dem bei einem bestimmten pH-Wert vorhandenen Anteil an ungeladenen Molekülen zu stehen, wie die weiteren Ausführungen verdeutlichen sollen. Dies scheint bei den Untersuchungen von Bartels und Schwantes nicht genügend beachtet worden zu sein.

Bei den Angaben über Ausschüttelungsversuche von Vitalfarbstoffen, die sich in der Literatur finden, ist die Höhe der Lipoidlöslichkeit meist rein visuell abgeschätzt und die relative Intensität dann durch eine verschiedene Anzahl von Kreuzen wiedergegeben worden. Nun ist es aber schwer, bei den meist intensiv leuchtenden und häufig auch fluoreszierenden Farben genauere Aussagen zu machen. Eine exakt photometrische Bestimmung erschien daher wünschenswert.

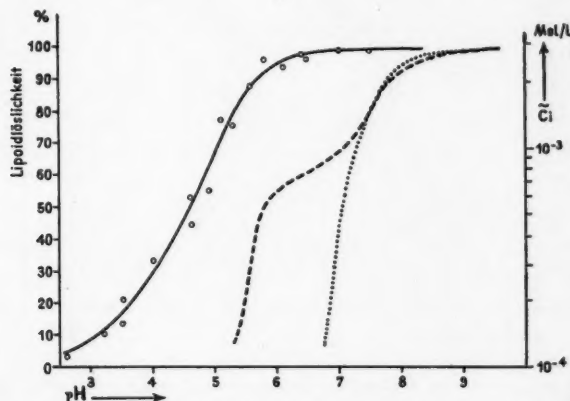


Abb. 5. Vergleich der Verteilung von Neutralrot zwischen einer wäßrigen Phase und Benzol mit der Neutralrotaufnahme in die Vakuole einer Oberepidermiszelle von *Allium cepa* bei verschiedenen pH-Werten. Linke Ordinate: Löslichkeit in Benzol = ——. Rechte Ordinate: Neutralrotkonzentration  $C_i$  in der Vakuole bei einer gebotenen Außenkonzentration von  $1 \cdot 10^{-4}$  Mol/Liter = ---- und Konzentration der undissoziierten Farbbasenmoleküle, multipliziert mit dem willkürlich gewählten Faktor 27 = ..... (Die letzten beiden Kurven sind entnommen aus Bartels und Schwantes, 1957, Abb. 5.)

Eine Komplizierung, wie sie die Konzentrationsbestimmung wäßriger Farbstofflösungen durch die Assoziationsbildung verursacht, kann hierbei ausgeschlossen werden.

Die Untersuchungen wurden mit dem Kompensationsphotometer von Leitz vorgenommen. Zur Ausschüttelung diente Benzol, die Adsorptionsbestimmung erfolgte durch ein Grünfilter von  $510 \text{ m}\mu$ . Die Meßpunkte sind Mittelwerte von je 5 Parallelansätzen mit jeweils 10 Ablesungen. Die Konzentration der wäßrigen Farbstofflösungen ist hierbei in weiten Grenzen ohne Bedeutung, da sich in jedem Fall ein Verteilungsgleichgewicht einstellt. Es muß aber beachtet werden, daß das maximale Lösungsvermögen des Benzols nicht überschritten wird; zur Darstellung kann bei völliger Entfärbung der wäßrigen Phase die Lipoidlöslichkeit dann = 100% gesetzt werden.



Die Ergebnisse sind in Abb. 5 dargestellt (linke Ordinate). Zum Vergleich ist die von Bartels und Schwantes (1957, Abb. 5) wiedergegebene Kurve der pH-Abhängigkeit der Neutralrotaufnahme in die Vakuole eingezeichnet, ebenso die Konzentration undissoziierter Basenmoleküle. Zur Einpassung wurde dabei die maximale Farbstoffaufnahme bzw. die Konzentration der Basenmoleküle = 100% gesetzt (rechte Ordinate).

Der Grad der Lipoidlöslichkeit läßt sich nun nicht ohne weiteres mit der direkten Konzentrationsangabe des in die Vakuole aufgenommenen Farbstoffes vergleichen. Die Aziditätsabhängigkeit der beiden Vorgänge zeigt

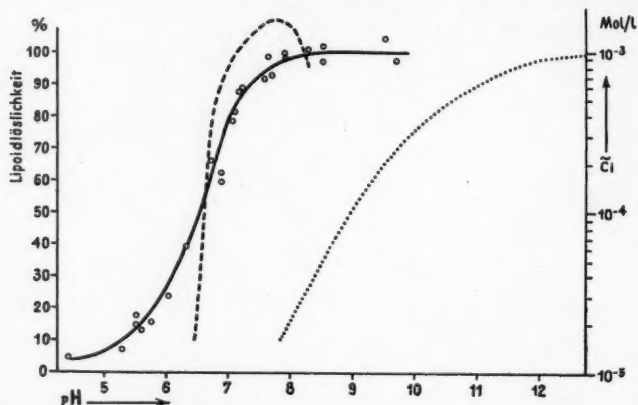


Abb. 6. Vergleich der Verteilung von Akridinorange zwischen einer wäßrigen Phase und Benzol mit der Akridinorangeaufnahme in die Vakuole einer Ober-epidermiszelle von *Allium cepa* bei verschiedenen pH-Werten. Linke Ordinate: Löslichkeit in Benzol = ———. Rechte Ordinate: Akridinorangekonzentration  $\bar{C}_i$  in der Vakuole = - - - - und Dissoziationskurve für Akridinorange nach Zanker = ..... (Die letzten beiden Kurven sind entnommen aus Bartels und Schwantes 1955, Abb. 9 a.)

jedoch, daß die Löslichkeit des Neutralrots in einer lipophilen Phase wesentlich größer ist, als dem in wäßriger Lösung bei einem bestimmten pH-Wert vorliegenden Anteil an undissoziierten Molekülen entspricht, da sich bei genügender Pufferung der Farbstofflösung sofort wieder das Dissoziationsgleichgewicht einstellt und neue Basenmoleküle in dem Maße entstehen, wie sie der wäßrigen Phase entzogen werden.

In der gleichen Weise wurden die Verteilung zwischen einer hydrophilen und einer hydrophoben Phase für das Akridinorange und das Thionin bestimmt (Abb. 6 und 7) und zum Vergleich wiederum die von Bartels (1954) bzw. Bartels und Schwantes (1955, Abb. 9) gemessenen Kurven über die Aufnahme der Farbstoffe in die Vakuole nebst den von den Autoren wiedergegebenen Dissoziationskurven für Thionin und Akridinorange (Zanker 1952) eingezeichnet.

Bartels und Schwantes (1955, 1957) diskutieren auf Grund ihrer Messungen über die Aufnahme von Akridinorange, Thionin und Neutralrot



hauptsächlich die unterschiedlichen Speicherungsverhältnisse der Farbstoffe in der sogenannten „leeren“ Vakuole. Nach den Angaben folgen das Thionin- und das Neutralrot-Basen-Molekül in bezug auf die pH-Abhängigkeit der Aufnahme und Speicherung streng ihren Dissoziationskurven. Das Speichermaximum liegt bei beiden Farbstoffen etwa 2 pH-Einheiten oberhalb ihrer  $p_K$ -Werte, die für Neutralrot zu 7,38 (Bartels 1956 b) und für Thionin zu 11,3 bestimmt wurden. Dies Verhalten stimmt mit den von Kinzel (1955) theoretisch berechneten Werten überein.

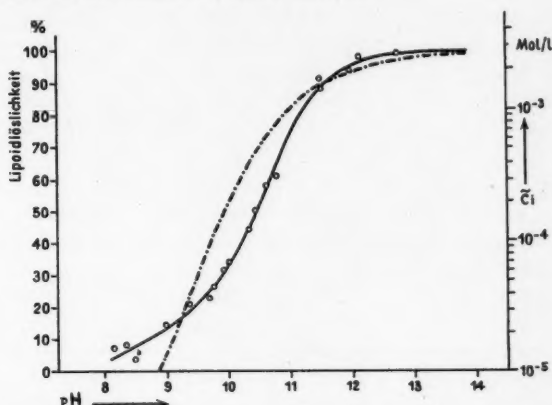


Abb. 7. Vergleich der Verteilung von Thionin zwischen einer wässrigen Phase und Benzol mit der Thioninaufnahme in die Vakuole einer Oberepidermiszelle von *Allium cepa* bei verschiedenen pH-Werten. Linke Ordinate: Löslichkeit in Benzol = —. Rechte Ordinate: Thioninkonzentration  $\bar{C}_i$  in der Vakuole und Außenkonzentration an undissoziierten Thionin-Molekülen = ---. Die Aufnahme des Thionins folgt streng der Dissoziationskurve (die letzte Kurve ist entnommen aus Bartels und Schwantes 1955, Abb. 9).

Beim Akridinorange wird eine maximale Farbstoffaufnahme dagegen schon 3 pH-Einheiten unterhalb des von Zanker (1952) gemessenen  $p_K$ -Wertes von 10,6, also bei pH 7,5, erreicht. Eine Erklärung für das abweichende Verhalten und eine Theorie des Aufnahmemechanismus wird von Bartels (1954) nicht gegeben.

Wie Bartels und Schwantes (1955) anführen, sind nach Untersuchungen von Drawert und Strugger (1938) und Rabinowitsch und Epstein (1941) ähnliche Verhältnisse auch beim Methylenblau anzunehmen. Die Stoffaufnahme ist nicht der Dissoziationskurve proportional, sondern setzt bereits 1–2 pH-Einheiten unterhalb des wahrscheinlichen  $p_K$ -Wertes von 13 ein.

Die in Abb. 5–7 wiedergegebene Verteilung der Farbstoffe zwischen einer hydrophoben und einer hydrophilen Phase in Abhängigkeit von der Azidität kann nun nicht ohne weiteres eine Erklärung für die unterschiedlichen Speicherungsverhältnisse in der Vakuole geben, läßt aber eine Deutung über den möglichen Aufnahmevergung zu.

In Übereinstimmung mit K i n z e l (1958 b) soll darauf hingewiesen werden, daß die aufgezeigten Kurven auch ohne Schwierigkeiten die Annahme einer Farbstoffpermeation durch das Plasma allein auf Grund der Lipoidlöslichkeit zulassen, ohne daß nichtosmotische oder metaosmotische Prozesse gefordert zu werden brauchen.

Ebenso wie die Aufnahme in die lebende Zelle steht auch die Lipoidlöslichkeit nicht in direktem Zusammenhang mit dem Verlauf der Dissoziationskurven bzw. den  $p_K$ -Werten der untersuchten Farbstoffe.

Beim Akridinorange ist die gleiche pH-Abhängigkeit der Vakuolenfärbung wie auch der Lipoidlöslichkeit festzustellen; beide Kurven steigen zwischen pH 6 und 7 steil an. Im Gegensatz zu S t r u g g e r (1940, 1949) und K ö l b e l (1947) erklärt besonders H ö f l e r (1947, 1948, 1949) die Farbstoffaufnahme ins Plasma und in die Vakuole ausschließlich auf Grund der Lipoidlöslichkeit.

Die Verhältnisse beim Neutralrot zeigen, daß auch aus sauren Lösungen, in denen der Farbstoff fast völlig, aber nicht restlos dissoziiert vorliegt, eine Aufnahme von Basenmolekülen denkbar ist. Damit ist über die Möglichkeiten einer Speicherung in der Zelle nichts ausgesagt. Die pH-Abhängigkeit einer Vakuolenfärbung wird in starkem Maße durch den jeweiligen Speichermechanismus bedingt. Dies beweist das unterschiedliche Verhalten der beiden Zwiebelepidermen. Bei den „vollen“ Unterepidermiszellen kann eine Zellsaftfärbung bereits nachgewiesen werden, während die Zellen der oberen Epidermis bei demselben pH-Wert der Außenlösung nur eine reine Membranfärbung erkennen lassen.

Die Aufnahme des Thionins folgt, wie B a r t e l s und S c h w a n t e s (1955) angeben, streng der Dissoziationskurve, d. h. dem Anteil an undissoziiert vorliegenden [Thio]-Molekülen (Iminobase), die wiederum in einem Gleichgewicht mit [Thio<sup>+</sup> OH<sup>-</sup>]-Molekülen (nicht ionisiertem Thioninhydroxyd) stehen (E p s t e i n, K a r u s h und R a b i n o w i t c h 1941). Abb. 7 zeigt, daß die Verteilung des Farbstoffes zwischen Benzol und wäßrigen Pufferlösungen ebenfalls dieser Kurve entspricht. Wie aus einem Vergleich mit den anderen untersuchten Stoffen hervorgeht, kann dies aber als reine Zufälligkeit bzw. typische Eigenschaft des Thionins angesehen werden. Dafür spricht auch die Größe der maximalen Löslichkeit des Farbstoffes in Benzol, wie gleich näher erörtert werden soll.

Zu den Ausschüttelungsversuchen mit Thionin ist noch zu sagen, daß nach dem Durchschütteln eine starke Erhöhung der Azidität der Pufferlösungen festgestellt werden kann. Die Kapazität des Puffers muß gegenüber den anderen Farbstoffen wesentlich erhöht werden, wenn der pH-Wert nicht absinken soll. Bei den Versuchen wurden deshalb die pH-Werte stets vor und nach dem Ausschütteln kontrolliert. Die Abnahme der Hydroxylionen-Konzentration deutet darauf hin, daß nicht die Iminobase, wenigstens nicht allein, sondern das undissoziierte Thioninhydroxyd in die hydrophobe Phase übergeht. Diese Erscheinung könnte auch für das abweichende Speicherungsverhalten des Thionins (Bartels und Schwantes 1955) Bedeutung haben (vergleiche auch K i n z e l 1954). Auf die Fragen der Speicherung soll hier aber nicht näher eingegangen werden.

Bartels und Schwantes (1957) weisen darauf hin, daß die Speicherung der drei Farbstoffe stark von der Art der Substitution beeinflusst zu sein scheint. Über die Aufnahmegeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Anzahl der vorhandenen Aminogruppen berichtet Bazin (1946). Bei den hier untersuchten Stoffen ergibt sich eine Reihe mit abnehmender Zahl der Methylgruppen vom Akridinorange über das Neutralrot zum Thionin. Methylgruppen erhöhen im allgemeinen die Hydrophobie der Verbindungen.

Wie sich feststellen ließ, nimmt nun auch in der gleichen Weise die absolute Lipoidlöslichkeit dieser Stoffe ab. Genauere Angaben liegen anscheinend hierüber noch nicht vor. Deshalb wurden hochkonzentrierte Lösungen der drei Farbstoffe stark alkalisch gepuffert ( $n/10$  NaOH), mit Benzol ausgeschüttelt und die in  $25\text{ cm}^3$  enthaltene Substanzmenge nach Verdampfen

Tab. 2. Gelöste Farbstoffmenge in  $25\text{ cm}^3$  Benzol ( $20-23^\circ$ )

Akridinorange	Neutralrot	Thionin
129,9 mg	8,7 mg	1,0 mg
121,2	7,2	0,8
72,4	10,9	1,1
116,5	10,0	1,0
170,0*)	9,3	1,6
121,1	9,7	1,0
139,8	10,5	0,8
1 10, mg	7,2 mg	1,1 mg
M.: 122,6 mg $\equiv 1,8 \cdot 10^{-2}\text{ mol/l}$	M.: 9,2 mg $\equiv 1,4 \cdot 10^{-3}\text{ m l/l}$	M.: 1,0 mg $\equiv 1,8 \cdot 10^{-4}\text{ mol/l}$

\* Die Lösung zeigt bereits eine Trübung.

des Lösungsmittels und Trocknung bei  $100^\circ$  gewogen (Tab. 2). Die einzelnen Gewichtsangaben sind Mittelwerte von jeweils 4 Parallelbestimmungen eines Ausschüttelungsansatzes.

Die Streuung der Werte ist hauptsächlich auf eine unterschiedliche Durchmischung zurückzuführen. Zu einer genaueren Bestimmung müssen die Ansätze in größerem Maße wiederholt werden. Aber diese orientierenden Proben zeigen bereits deutlich die Unterschiede. So verhält sich die Löslichkeit des Akridinorange, Neutralrots und Thionins etwa wie  $100 : 10 : 1$ .

Die Konzentration in der abgetrennten organischen Phase läßt sich durch Einengen noch erhöhen, ohne daß es zu Ausscheidungen kommt. Jedoch wurden stets nur frisch ausgeschüttelte Lösungen verwendet, da besonders das Thionin bei Benutzung normaler Glasgefäße schnell Zersetzungserscheinungen zeigt (Epstein, Karush und Rabinowitch 1941).

Die Größe der maximalen Lipoidlöslichkeit steht in guter Übereinstimmung mit der Verteilung der Farbstoffe zwischen einer hydrophilen und hydrophoben Phase in Abhängigkeit von der Azidität. Interessant ist noch ein Vergleich der in der Literatur angegebenen  $p_K$ -Werte mit den pH-Werten, bei denen sich ein Verteilungskoeffizient von 1 einstellt. Beim Akridin-

orange liegt dieser Wert 4, beim Neutralrot ungefähr 3 pH-Einheiten unterhalb des  $p_K$ , beim Thionin etwa eine pH-Einheit.

Bartels und Schwantes (1955) weisen darauf hin, daß in der Aufnahme und Speicherung von Akridinorange und Thionin erhebliche quantitative Unterschiede bestehen, obwohl die Dissoziationskonstanten dieser beiden Stoffe kaum voneinander abweichen. So wird der Umschlagspunkt von einer Membran- zu einer Vakuolenfärbung ruhender Zwiebeln von Strügger (1940) für Akridinorange bei pH 6,5, von Drawert (1940) für Thionin bei pH 8,5–9,5 (Bartels und Schwantes, 1955: pH 10,1) ermittelt. Die Befunde über die unterschiedliche Affinität der beiden Farbstoffe zu lipophilen Lösungsmitteln können als eine plausible Erklärung dieser Erscheinung angesehen werden.

Es ist nun natürlich nicht gesagt, daß die Löslichkeit der ungeladenen Farbstoffbasen in Benzol als Modellsubstanz ohne weiteres mit dem Lösungsvermögen der lipoiden Phasen des Plasmas gleichgesetzt werden kann. Vor allem müßten noch andere hydrophobe Medien, native Öle usw., wie sie vielfach mit Erfolg zu Modellversuchen benutzt worden sind, in Verbindung mit weiteren Farbstoffen für diese Zwecke herangezogen werden, ehe man eine gesicherte Aussage machen kann.

Die Untersuchungen zeigen jedoch deutlich, daß die Aufnahme der drei betrachteten Farbstoffe in die Zelle nur innerhalb solcher cH-Bereiche erfolgt, bei denen sich im Ausschüttelungsversuch das Verteilungsgleichgewicht in starkem Maße zur lipoiden Phase neigt.

## B. Versuche mit reduziertem Neutralrot

### a) Darstellung und Eigenschaften

Bei Untersuchungen über die Natur der sekundären grünen Vakuolenfluoreszenz, die unter der Bestrahlung auftritt, führten Drawert und Metzner (1956) vergleichsweise auch Versuche mit reduziertem Neutralrot durch. Sie konnten zeigen, daß das Bestrahlungsprodukt nicht mit der reduzierten Form des Farbstoffes identisch ist, da dieses im elektrischen Feld zur Kathode wandert. „Andererseits scheint aber zwischen beiden fluoreszierenden Komponenten doch eine Beziehung zu bestehen, da in den bestrahlten reoxydierten Lösungen die zur Kathode wandernde fluoreszierende Komponente etwa in dem Maße verschwindet, wie die zur Anode wandernde entsteht.“

Diese Verhältnisse sollen noch näher analysiert werden. Dies scheint besonders wichtig im Hinblick auf die Untersuchungen von Kiermayer (1955, 1956<sup>1</sup>), der feststellte, daß das Neutralrot, trotz seinem hohen negativen Redoxpotential (rH 4–7,5), in bestimmten Algenzellen unter Luftabschluß reduziert werden kann.

<sup>1</sup> Zu der Arbeit von Kiermayer (1956) muß erwähnt werden, daß wohl durch ein Versehen die Bezeichnungen „voller“ und „leerer“ Zellsaft verwechselt worden sind. Um weitere Irrtümer zu verhindern, möchte ich hierauf hinweisen, da derselbe Fehler auch in einem Referat von F. Weber (Wetzlar) in der Z. f. wiss. Mikr. 64, 62 (1958) erscheint.

Wesentlich bei allen Vitalfärbeversuchen ist, von chemisch absolut reinen Substanzen auszugehen. Deshalb benutzte ich für meine Untersuchungen abweichend von den genannten Autoren und Miličić (1957), die das mit Rongalit reduzierte Neutralrot direkt verwendeten, das reine „Fluoreszent X“ nach den Angaben von Clark und Perkins (1932). Zur Reindarstellung wird eine konzentrierte Farblösung mit Natriumdithionit im Überschuß versetzt und zu der reduzierten Lösung Kalilauge gegeben. Das Fluoreszent X fällt in langen gelben Nadeln aus, die nach gründlichem Waschen mit destilliertem Wasser getrocknet werden. Das trockene gelbliche Pulver ist, wie auch Lewis (1935) beschreibt, jahrelang haltbar. In Wasser ist der Farbstoff nur zu einem geringen Teil löslich, die Lösung zeigt aber trotzdem eine kräftige Gelbfärbung, die schon im diffusen Tageslicht von einer intensiven grüngelben Fluoreszenz überlagert wird.

In der Elektrophoreseapparatur wandert Fluoreszent X stets zur Kathode, im sauren Gebiet wesentlich stärker als im alkalischen. Auch bei pH 12 trägt der Farbstoff noch eine Ladung. Nach Angaben von Kiermayer (1956) läßt er sich bei keinem pH-Wert mit Benzol ausschütteln.

Die Wanderung ist im allgemeinen wesentlich schneller als die des oxydierten Farbstoffes, genaue Angaben hierüber können nicht gegeben werden, da im sauren Pufferbereich unter pH 3 rasch eine Umfärbung zum Neutralrot stattfindet.

#### b) Vitalfärbung mit „Fluoreszent X“

Kiermayer (1955, 1956) führte hauptsächlich Färbungen an Algenzellen durch, daneben vergleichsweise auch an Zwiebelzellen. Er fand in der Anwendung von reduziertem Neutralrot eine gute Methode, um „leere“ und „volle“ Zellsäfte zu unterscheiden, wobei sich auch noch Unterschiede innerhalb dieser beiden Gruppen auf Grund metachromatischer Farbtöne zeigten. Miličić (1957) führte die Versuche an vollen Zellsäften von 11 höheren Pflanzen weiter fort. Drawert und Metzner (1956) benutzten weitgehend reoxydiertes Neutralrot. Dabei bestand die Gefahr, daß zwei verschiedene Prozesse sich bei der fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung überlagerten: 1. die Anfärbung mit noch nicht reoxydiertem Fluoreszent X und dessen Verhalten während der Strahleneinwirkung, 2. eine normale Neutralrotfärbung, die den von Strugger (1940) beschriebenen Fluoreszenzumschlag zeigt. So schien es nötig, noch einmal eine genaue Analyse der Vitalfärbung mit dem reinen Fluoreszent X an den Zwiebel-Oberepidermiszellen wiederzugeben. Die Färbezeiten betrugen 10 Minuten bis zu einer Stunde. Verwendet wurden die üblichen Phosphatpuffer.

pH 3,5: Im Hellfeld ist nur eine schwache Gelbfärbung der Membran zu beobachten, die im Blaulicht intensiv gelb fluoresziert. Plasma, Kern und Vakuole sind fluoreszenzfrei, soweit es sich durch die starke Membranfluoreszenz beurteilen läßt.

pH 4,8: Das Bild entspricht dem von pH 3,5.

pH 6,2: Die intensive Membranfluoreszenz ist unvermindert, gelegentlich leuchten auch die Vakuolen gelb durch, was besonders für Wundrandzellen zutrifft. Das Bild ist schwer analysierbar, da die Membran alles überstrahlt. Ein Teil des Farbstoffes wird ausgewaschen, so daß die Pufferlösung nach und nach stärker fluoresziert. Nach Plasmolyse mit  $\text{KNO}_3$  erscheint der gelbe Farbstoff auch im extraplasmatischen Raum.

- pH 6,8: Im Hellfeld erscheint das ganze Epidermishäutchen schwach gelblich. Im Blaulicht fluoreszieren Membran und Vakuole gleichermaßen rein gelb. Das Plasma ist ungefärbt. Während der Beobachtung tritt ein Nachlassen besonders der Vakuolenfluoreszenz auf, während die Membranfärbung unverändert bleibt bzw. sogar an Intensität gewinnt. Dies kann aber nicht entschieden werden, da es sich möglicherweise um einen rein optischen Effekt handelt, indem nur der Kontrast erhöht wird.
- pH 8,5: Hier zeigen die Vakuolen eine intensive gelbe Fluoreszenz. Die Membran leuchtet nur noch ganz schwach auf. Während der Beobachtung wird die Vakuolenfluoreszenz stark vermindert bzw. auch völlig gelöscht. Die Zeit ist von der Dauer der Anfärbung (15 Sekunden bis 5 Minuten), also vom Grad der Farbstoffspeicherung, abhängig. Wird das Epidermishäutchen für 15 Sekunden in dem Farbpuffer belassen, ist im allgemeinen nur eine sehr schwache Vakuolenfluoreszenz zu beobachten, die Wundränder speichern den Farbstoff etwas stärker, aber mit der gleichen gelben Fluoreszenz. Bei noch kürzeren Färbezeiten läßt sich das Fluoreszent X nur in den Wundrandzellen nachweisen. Farbunterschiede, wie sie das Neutralrot im Hellfeld zwischen dem zentralen Zellbereich des Epidermishäutchens und den gereizten Zellen des Schnittandes zeigt, können hier im Blaulicht nicht nachgewiesen werden. Im gewöhnlichen Licht erscheinen die Wundränder stärker gelb bis bräunlich tingiert. Während aber die Fluoreszenz bei den ungereizten Zellen fast augenblicklich gelöscht wird, behalten die Wundrandzellen ihre Fluoreszenz länger bei, obwohl auch hier nach längerer Bestrahlung eine Abschwächung eintritt.
- pH 10,5: Nur die Vakuole zeigt eine intensive gelbe Fluoreszenz, deren Löschung einmal von der Färbezeit abhängig ist, dann aber auch in hohem Maße von dem Alter des verwendeten Quecksilberbrenners. So machte sich nach ungefähr 30- bis 40stündiger Brenndauer ein starker Intensitätsabfall des Erregerlichtes bemerkbar.

Die Beobachtungen wurden mit der großen Fluoreszenzeinrichtung von Zeiss durchgeführt. Zur Kontrolle benutzte ich auch das Licht einer Kohlenbogenlampe (siehe unter „Methodik“). Damit wurde innerhalb normaler Beobachtungszeiten keine Fluoreszenzlöschung festgestellt.

#### c) Modellversuche. Deutung der Ergebnisse

Auch im Modellversuch läßt sich die Fluoreszenzlöschung beobachten, wenn eine wäßrige Farblösung für 30 bis 60 Minuten der Strahlenwirkung ausgesetzt wird. Sie tritt analog zu der Neutralrot-Zersetzung auch hier nur bei Sauerstoffgegenwart auf. Wird vorher ein Stickstoffstrom durch die Lösung geleitet, findet keinerlei Veränderung statt. Die Erscheinung der Fluoreszenzlöschung scheint nicht mit einer Reoxydation zum Neutralrot verbunden zu sein, denn die bestrahlte Lösung besitzt eine hell gelblichbraune Eigenfarbe. Ein roter Farbton tritt nicht auf. Allerdings muß beachtet werden, daß die Konzentration trotz der intensiven Fluoreszenz sehr gering ist.

Ähnliche Farbtöne erhält man, wenn eine desoxygenierte Fluoreszent-X-Lösung in einer Stickstoffatmosphäre mit sauerstofffreier Salzsäure versetzt wird. Das Fluoreszent X behält eine gelblichbraune Farbe, die Fluoreszenz verschwindet sofort, während an Luft augenblicklich ein Umschlag



nach Rot erfolgt. Die Farbtiefe ist davon abhängig, wie weit der Sauerstoff entfernt werden konnte.

Nach Drawert und Metzner (1956, S. 375, Abs. 4) entstehen bei der langsamen Reoxydation einer mit Natriumdithionit reduzierten Neutralrot-Lösung eine grün und eine weißgrün fluoreszierende Komponente, die sich chromatographisch nachweisen lassen. Um deren Ladungsverhältnisse kennen zu lernen, brachte ich ein entwickeltes eindimensionales Papierchromatogramm in die Elektrophoreseapparatur. Beide Farbflecke wanderten zur Anode (Abb. 8).

Zu den durch die Bestrahlung entstehenden Zersetzungsprodukten bestehen keine Beziehungen. Vom völlig reoxydierten Neutralrot konnten die beiden Komponenten mit Zellulosepulver getrennt werden. Eine Reingewinnung wurde jedoch nicht erzielt, da die Lösung sich nicht völlig von dem zugesetzten Reduktionsmittel befreien ließ. Sie hat eine gelbliche Farbe und zeigt weißlichgrüne Fluoreszenz. Vitalfluorochromierungen können hiermit durchgeführt werden. Wie auch bei anderen sauren Farbstoffen ist bei zunehmender Azidität der Pufferlösung eine verstärkte Speicherung im Plasma und Zellkern festzustellen. Durch die gleißend gelbe Fluoreszenz heben sich die feinsten Plasmastränge deutlich von der dunklen Vakuole ab. Die Färbung ist diffus, bestimmte Granula treten nicht hervor. Eine lebhaft Plasmaströmung deutet auf volle Vitalität der Zellen. Einzelne Wundrandzellen zeigen eine Aufquellung in den Zellwickeln. Ein Nachlassen der Fluoreszenzintensität wird nicht beobachtet.

Mit Toluol, Benzol, Chloroform, Hexan lassen sich die Komponenten bei keinem pH-Wert ausschütteln, ebenso ist auch im stark sauren Gebiet die Wanderung im elektrischen Feld nicht merklich vermindert.

Um den Zusatz eines schwer entfernbaren Reduktionsmittels zu vermeiden, wurde auch mit Wasserstoff reduziert. Als Katalysator diente Palladium-Lösung nach P a a l. Auffallend ist, daß sich nach Reoxydation die beiden sauren Komponenten nicht nachweisen ließen, ebenso wenig nach Verwendung von Zink und Salzsäure. Es wird deshalb vermutet, daß es sich bei den beiden negativ geladenen Anteilen nur um ein Reaktionsprodukt des reduzierten Neutralrots mit dem Natriumdithionit handelt. Merkwürdig ist auch, daß der Anteil der sauren Komponenten stets ungefähr gleich war, unabhängig von der Menge des zugesetzten Reduktionsmittels. Dies könnte auf eine Verunreinigung des Neutralrots hinweisen, die sich bis jetzt chromatographisch nicht hat nachweisen lassen.

Die durchgeführten Untersuchungen können eine Erklärung für die von Drawert und Metzner (1956) mitgeteilten Befunde geben (S. 377, Abb. 5). In der

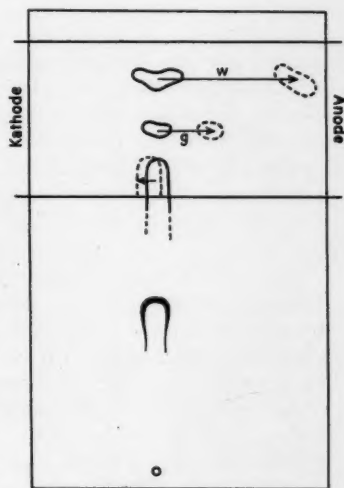


Abb. 8. Eindimensionales Papierchromatogramm einer reoxydierten Neutralrotlösung. Mit dem mittleren Teil wurde anschließend eine Elektrophorese durchgeführt. Phosphatpuffer pH 6,1; Laufzeit 7 Std., w = weißgrüne Fluoreszenz, g = grüne Fluoreszenz.



von den Autoren verwendeten reoxydierten Neutralrotlösung lag noch ein Teil des Farbstoffes in der reduzierten Form vor, der im elektrischen Feld zur Kathode wanderte. Durch die Bestrahlung der Lösung tritt mit der Fluoreszenzlöschung eine Veränderung des Farbstoffes ein, über die hier nichts ausgesagt werden kann. Gleichzeitig wird der als Base vorliegende Anteil des Neutralrots im kurzwelligen Licht photooxydativ zu grün fluoreszierenden sauren Zwischenprodukten abgebaut. Es handelt sich also um die Überlagerung von zwei vollkommen getrennten Vorgängen.

Der Aufnahmemechanismus für Fluoreszent X, der zu einer Speicherung des Farbstoffes in der Vakuole führt, war bisher unbekannt. Die Tatsache der starken elektrophoretischen Wanderung auch im alkalischen Bereich, ebenso die Angabe von Kiermayer (1955), daß reduziertes Neutralrot sich bei keinem pH-Wert in Benzol ausschütteln läßt, könnte für eine Ionen-intrabilität sprechen. Dem steht aber in gewisser Weise entgegen, daß das Plasma stets fluoreszenzfrei bleibt. Selbst geringe Farbstoffmengen müßten bei der intensiven Fluoreszenz nachweisbar sein. So ist eine Fluoreszenz immer nur in der Vakuole nachzuweisen, wenn eine alkalische Farblösung erst während der Beobachtung zugegeben wird. Dasselbe ist der Fall, wenn man von plasmolysierten Zellen ausgeht und den Farbstoff in Zuckerlösung darbietet.

Ich wiederholte die Ausschüttelungsversuche mit Benzol und prüfte noch andere lipophile organische Medien auf ihr Lösungsvermögen sowohl für reduziertes Neutralrot als auch für das reine Fluoreszent X, da der Zusatz eines Reduktionsmittels für die Farbstoffverteilung von Bedeutung sein kann. Wird eine Neutralrotlösung 1 : 10.000 reduziert, so nimmt sie eine olivgrüne Farbe an. Nach Ausschüttelung mit Benzol bei pH 8,3 bleibt dieses farblos, auch die wäßrige Phase zeigt keine Farbaufhellung, die auf einen Farbstoffübertritt schließen läßt. Im UV-Licht zeigt das Benzol nur eine etwas verstärkte bläuliche Fluoreszenz (vgl. dazu auch S. 551 f.). Mit Wasser läßt sich wegen der geringen Löslichkeit nur eine hellgelbe Farblösung herstellen, die bei Pufferung auf pH 8 bis 9 noch etwas ausblaßt. Auch die Fluoreszenz wird verringert. Nach Clark und Perkins (1932) bildet sich dabei die farblose Leukobase. Nach Ausschüttelung mit Benzol ist die wäßrige Phase noch stärker aufgehellt, das Benzol farblos; höchstens ein ganz schwacher gelblicher Schimmer ist zu sehen, der aber auch auf geringe Wasserspuren zurückgeführt werden könnte. Um diese zu entfernen, wird die organische Phase durch ein dickes Papierfilter geschickt, das sich dabei gelb anfärbt. Die Fluoreszenz bleibt schwach hellblau. Wird das Benzol nun wieder mit destilliertem Wasser durchgeschüttelt, so zeigt diese eine gelbe Farbe und unter der Quarzlampe die bekannte intensive grüngelbe Fluoreszenz.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das stark fluoreszierende reduzierte Neutralrot in schwach alkalischen Lösungen in eine Leukoverbindung überführt wird. Die Tatsache, daß der Körper farblos ist und auch keine Fluoreszenz aufweist, ist der Grund dafür, daß die Lipoidlöslichkeit dieses Stoffes bis jetzt übersehen worden ist. Damit ist auch der Mechanismus der Farbstoffaufnahme in die

Zelle geklärt, und die Speicherung in den leeren Zellsäften der *Allium*-OE kann nach dem Prinzip der Ionenfalle (Höfler 1947) gedeutet werden entsprechend dem  $\text{cH}$ -Gefälle zwischen Außenlösung und Vakuole (Drawert 1948, 1956). Für die vollen Unterepidermen werden die gleichen Speichermechanismen gelten wie auch für das Neutralrot und andere basische Farbstoffe.

## II. Untersuchungen mit Pyroninfarbstoffen

Der Einfluß von Licht und kurzwelligen UV-Strahlen auf gefärbte Körper ist schon vielfach Gegenstand von Untersuchungen gewesen, wobei die Frage nach der Lichtechtheit von Farbstoffen für die Technik von Bedeutung war. Meist handelt es sich dabei wohl um photooxydative Zerstörungen bei Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und eventuell auch Wasserdampf. Es können aber ebenso Reduktionen oder andere Reaktionen ein Ausbleichen bewirken. Ein Farbstoff, der in dieser Beziehung noch näher untersucht werden muß, ist das Pyronin.

Nachdem der Farbstoff früher vielfach zur Tingierung fixierter biologischer Objekte verwendet worden war, führte Drawert (1940) eine allgemeine Analyse der Farbstoffeigenschaften für Vitalfärbungen an Pflanzenzellen durch. Strugger (1941) beschreibt das Pyronin zum erstenmal als „zweifarbigen Fluoreszenzindikator“ und betont seine Verwendungsmöglichkeit für chemische Titrations wegen des engen Umschlagbereiches.

Im sauren und schwach alkalischen pH-Bereich liegt das rote, gelb fluoreszierende Kation vor, während sich im stark basischen Milieu über pH 10,5 die Farbbase ausbildet. Eine Veilfluoreszenz im Übergangsbereich wird dem undissoziierten Farbsalz zugeschrieben. Die Base besitzt ausgeprägte lipophile Eigenschaften, so daß sie sich fast quantitativ in organischen Lösungsmitteln anreichern läßt. Die Pyroninbase soll eine intensive ultramarinblaue Fluoreszenz zeigen. Ebenso gelingt es bei Vitalfärbungsversuchen an *Allium*-Oberepidermen, eine kräftige blaue Plasmafluoreszenz zu erzielen, womit lipophile Phasen des Protoplasten nachgewiesen werden können (siehe auch Strugger 1949). Perner (1952) bestätigt diese Angaben. Eine Vakuolenfärbung tritt im allgemeinen nicht ein.

Boerner (1950) verwendet Pyronin zu Fluorochromierungsstudien an der Säugerhaut. Ein altes Farbstoffpräparat von Grubler wird dazu benutzt, das in Lösung stärker dissoziiert vorliegen soll, da der Umschlagpunkt gegenüber den Angaben von Strugger weiter zur alkalischen Seite hin verschoben ist. Bevor der Farbstoff in die blaufluoreszierende Phase übergeht, ist ein deutlicher Intensitätsabfall der gelben Fluoreszenz zu bemerken. Ebenso wie beim Akridinorange werden auch beim Pyronin schwächere Konzentrationseffekte beschrieben (Boerner-Patzelt 1950).

In einer weiteren Arbeit von Boerner (1952) werden reine und gemischte Fettsubstanzen auf ihre Fluoreszenz geprüft. Beim Lezithin, das sowohl hydrophile als auch hydrophobe Gruppen enthält, sind je nach dem pH-Wert des Farbpuffers nach Pyroninbehandlung gelbe oder bläuliche Fluoreszenzfarben zu beobachten.

Sowohl an lebenden als auch an toten Zellen (Fixation mit HCl oder kurzfristige Behandlung mit Alkohol) und an einem angefärbten Gelatine-

Benzol-Modell findet Strügger eine starke Strahlenempfindlichkeit der blau fluoreszierenden Pyroninbase. Es „bewirkt eine UV-Bestrahlung sowohl am Modell als auch in der Zelle eine Änderung der in der lipophilen Phase gelösten Farbbase zum undissoziierten Farbsalz, welche dann in der Farbe der Kationen in beiden Fällen im Eiweißsystem gespeichert wird“.

Am Gelatine-Benzol-Modell konnte Strügger zeigen, daß sich nach einer bestimmten Erholungszeit im Dunkeln die ursprüngliche Farbstoffverteilung einstellte. Die Benzoltröpfchen fluoreszierten wieder blau. Die Umwandlung der Farbbase zum Farbsalz oder -kation durch die UV-Strahlen müßte demnach ein reversibler Vorgang sein, der von der lebenden Zelle völlig unabhängig ist. Es liegt auch hier, ebenso wie beim Neutralrot, eine direkte Einwirkung der energiereichen Strahlung auf den Farbstoff vor. Die Verhältnisse sollen im folgenden näher untersucht werden.

### A. Analyse des Pyronins

#### a) Vergleichende Untersuchungen über verschiedene Pyronin-Präparate

Drawert (1956) weist nachdrücklich darauf hin, wie wichtig es ist, bei der Verwendung von Farbstoffen für physiologische Versuche die Herkunft genau anzugeben. Am Beispiel des Pyronins wird durch chromatographische Analyse gezeigt, daß bei den verschiedenen Fabrikaten sowohl abweichende Stoffe vorliegen müssen als auch unterschiedliche Verunreinigungen oder NebenkompONENTEN vorhanden sind. Hierauf haben auch Sibatani und Fukuda (1951) hingewiesen und gleichzeitig ein Reinigungsverfahren für Pyronine angegeben (Sibatani 1952). Diese Verunreinigungen können zur Erzielung bestimmter Vitalfärbungseffekte entscheidend beitragen. Andererseits können auch Präparate mit verschiedenen Handelsbezeichnungen weitgehend identisch sein (Drawert und Gutz 1953; Drawert 1955; Drawert und Metzner 1955; Mix 1958).

Es ist mir leider nicht gelungen, ein Präparat von Hollborn & Söhne (Leipzig) zu bekommen, das Drawert (1940) und Strügger (1941) für ihre Untersuchungen benutzten. Perner (1952) gibt keine Bezeichnung an. Deshalb schien es wesentlich, zuerst das Verhalten von Farbstoffen verschiedener Herkunft (s. S. 520) zu untersuchen und mit den Angaben der Autoren zu vergleichen.

Die Pyronine gehören zur Klasse der Xanthenfarbstoffe. Nach der Art der Substituenten der beiden symmetrischen Aminogruppen unterscheidet man ein Tetramethylderivat = Pyronin G (Syn. P. Y) und eine Tetraäthylverbindung = Pyronin B. Akridinrot gehört ebenfalls zu den Xanthenen und stellt ein niederes Homolog dar; es ist das symmetrische Dimethylaminoderivat und entsteht aus Pyronin G durch oxydative Abspaltung zweier Methylgruppen.

Die von Strügger (1941) angeführte Formel entspricht dem Pyronin G. Die Farbstoffe von Grübler-Chroma<sup>1</sup> bilden mit Alkalien einen hellroten Niederschlag.

<sup>1</sup> Nach freundlicher Auskunft der Fa. Chroma, Stuttgart-Untertürkheim, bestehen zwischen beiden Präparaten nur Unterschiede hinsichtlich des Reinheitsgrades; es handelt sich um die Tetramethylverbindung, das Farbsalz liegt als Chlorid vor.

Tab. 3. Vergleich einiger Pyroninreaktionen mit Literaturangaben

Die Angaben über Pyronin G und Pyronin B sind zusammengestellt aus den Farbstofftabellen von Schultz, 7. Aufl. 1931, Beiträgen im Beilstein, 4. Aufl., Bd. 18 (1931), und den Untersuchungen von Biehringer (1896).

**Pyronin G**

in Alkohol:	rot, gelbe Fluoreszenz
in H <sub>2</sub> O:	rot, gelbe Fluoreszenz
+ NaOH:	blaßroter Niederschlag
löslich in:	Alkohol, Aceton, Chloroform: rot, gelbe Fluoreszenz; Benzol, Schwefelkohlenstoff, Äther: gelb, ohne Fluoreszenz; Ligroin: rot, wird beim Erwärmen hellgelb
+ HCl:	hellorange Lösung
+ rauch. HCl:	braun, ohne Fluoreszenz
+ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> :	rotgelbe Lösung

**Pyronin B**

in Alkohol:	rot, rötlichgelbe Fluoreszenz
in H <sub>2</sub> O:	rot, rötlichgelbe Fluoreszenz. Blaustichiger als Pyronin G
+ NaOH:	blaßroter Niederschlag
+ HCl:	helloranger Niederschlag
+ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> :	rotgelbe Lösung

**Pyronin (Merck)**

in Alkohol:	rot, rötlichgelbe Fluoreszenz
in H <sub>2</sub> O:	bläulichrot, rötlichgelbe Fluoreszenz
+ NaOH:	schwache Aufhellung, kein Niederschlag; nach Ausschüttelung mit neutralen lipophilen Lösungsmitteln bleiben diese farblos, Fluoreszenz schwach bläulich
+ HCl:	heller rot, kein Niederschlag
+ rauch. HCl:	hellrot, Fluoreszenz verringert
+ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> :	rotgelbe Lösung

**Pyronin extra (Grübler-Chroma)**

in Alkohol:	gelbrot, intensive gelbgrüne Fluoreszenz
in H <sub>2</sub> O:	rein rote Lösung, starke gelbe (grünliche) Fluoreszenz
+ NaOH:	Entfärbung und roter Niederschlag
löslich in:	Alkohol, Aceton, Chloroform: rot, gelbe Fluoreszenz; Benzol, Toluol: gelb, Fluoreszenz sehr schwach; Ligroin: gelb, beim Erwärmen keine Änderung
+ HCl:	orange Lösung, roter Niederschlag
+ rauch. HCl:	orange gelb, grünliche Fluoreszenz
+ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> :	orange gelb, grünliche Fluoreszenz

**Pyronin B echt stand. (Bayer)**

in Alkohol:	dunkelrot, blaustichiger als P. (Grübler), violettrote Fluoreszenz
in H <sub>2</sub> O:	bläulichrot, rotgelbe Fluoreszenz
+ NaOH:	dunkelroter Niederschlag, Entfärbung der Lösung
löslich in:	Alkohol, Aceton, Chloroform: violettstichiges Rot (Fluoreszenz: intensiv hellblau); Benzol, Toluol: nur zum Teil löslich mit bläulichroter Farbe (Fluoreszenz: intensiv dunkelblau)
+ HCl:	heller rot, Fluoreszenz dunkler
+ rauch. HCl:	orange gelb, keine Fluoreszenz
+ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> :	dunkelgelb, keine Fluoreszenz

der sich mit gelbrotem Farbtön in neutralen lipophilen Lösungsmitteln löst (Tabelle 3). Dieses Präparat benutzte Höfler (1949) zur fluoreszenzmikroskopischen Unterscheidung von „leeren“ und „vollen“ Zellsäften. Er fand abweichende Ergebnisse von dem anfangs Erwähnten, so vor allem eine gelb- bis ockerbraune Vakuolenfluoreszenz. Struggers Annahme einer Ioneninetrabilität ins ungeschädigte Plasma lehnt Höfler ab (vgl. auch Höfler 1953). In der ausgeprägten Lipoidlöslichkeit der Farbbase (P. Grübler) dürfte eine Erklärung für die von Höfler beschriebenen Vakuolenfärbungen zu sehen sein. Es soll hier noch hervorgehoben werden, daß der „alte“, von Boerner (1950, 1952) benutzte Pyroninfarbstoff von Grübler nicht mit dem in dieser Arbeit angeführten und wohl auch von Höfler verwendeten Präparat von Grübler identisch sein kann, da sich mit diesem nie eine blaue Fluorochromierung von Lipoiden erzielen ließ. Auf weitere vergleichende Vitalfärbungen mit den verschiedenen Handelsprodukten soll hier nicht mehr näher eingegangen werden.

Aus dem Präparat von Schuchardt-Görlitz läßt sich nach alkalischer Pufferung mit Benzol eine gelbe, gelbgrün fluoreszierende Verbindung ausschütteln, die im Chromatogramm einen sehr geringen  $R_f$ -Wert aufweist. Auch die Hauptkomponente verhält sich anders als die von Drawert (1956) erwähnten Farbstoffe.

Das Pyronin B echt stand. von Bayer gibt nach Alkalizusatz sofort einen dunkelvioletten Niederschlag, der sich z. T. in hydrophoben Medien mit rotvioletter Farbe löst. Nach Filtration ist die Lösung schwach violett und fluoresziert zunächst noch gelblich, später etwas bläulich.

Nach Drawert (1940) ist das Pyronin (Hollborn & Söhne) im pH-Bereich von 2 bis 11,5 in Toluol unlöslich. Strugger (1941), der auch im ultravioletten Licht untersuchte, entdeckte die starke ultramarinblaue Fluoreszenz in organischen Lösungsmitteln.

Die bisher erwähnten Farbstoffe kamen also auf Grund des abweichenden Verhaltens für meine Untersuchungen zuerst nicht in Frage. Verwendet wurde deswegen das Präparat von Merck. Pyronin stand. (Bayer) ist, wohl mit diesem übereinstimmend. Es schien mir aber wesentlich, die Versuche mit einem heute im Handel befindlichen Farbstoff zu wiederholen, da die Fa. Bayer die Produktion dieses Fabrikates eingestellt hat.

Bei dem Artikel Nr. 7517 von Merck soll es sich nach freundlicher Auskunft der Firma ebenfalls um das in den Schultzschen Farbstofftabellen (7. Aufl.) unter der Nr. 853 aufgeführte „Pyronin G“, also das Tetramethyldiaminoxanthylumchlorid, handeln. Als Summenformel wird  $C_{17}H_{16}N_2OCl$  angegeben. Die Eigenschaften stimmen aber bei einfachen Reaktionen nicht mit den Literaturangaben für diesen Farbstoff überein, wie aus Tabelle 3 zu entnehmen ist.

Biehinger (1896) hat die Pyronine einer genaueren Analyse unterzogen. Er erwähnt, daß die damaligen kommerziellen Produkte wegen starker Verunreinigungen für exakte Untersuchungen nicht verwendbar seien, und stellte sich die Substanzen selbst her.

Aus Tab. 3 geht hervor, wie vorsichtig man bei der Verwendung und Beurteilung von Farbstoffen für physiologische Versuche sein muß. Die rein visuellen Angaben über die Farbnuancen werden immer abweichend sein, wenn keine genau definierten Konzentrationen vorliegen. Besonders auffallend ist jedoch das unterschiedliche Verhalten nach Zusatz von Kalilauge. Während Biehinger (1896) eine in Benzol, Toluol usw. mit gelber Farbe lösliche Base angibt (vgl. Pyronin-Grübler), kann diese bei dem von mir verwendeten Präparat nicht nachgewiesen werden. Die farblose

Phase fluoresziert jedoch ganz schwach bläulich. Dies stimmt mit den von Drawert (1940) und Strugger (1941) für Pyronin (Hollborn) gemachten Angaben überein. Strugger gibt jedoch an, daß nach dem Überschreiten des Umschlagbereiches ein Teil der schwerer löslichen Farbbase ausflockt, ähnlich wie es beim Neutralrot der Fall ist. (Leider wird die Farbe des Niederschlages nicht angegeben.) Dies trifft hier nicht zu. Ein Ausflocken der Farbbase konnte ich bei dem von mir benutzten Präparat nicht beobachten. Erst nach längerem Stehen zeigt sich eine ganz geringe schleierartige Trübung, die noch näher analysiert werden wird (S. 556).

#### b) Analyse des Pyronins (Merck)

Wird eine frisch mit tertiärem Phosphat gepufferte Farblösung zu Vitalfärbungen benutzt, so ist im Fluoreszenzmikroskop (UV als Erregerlicht) keine blaue Plasmafluoreszenz zu beobachten. Die Lösung selbst zeigt eine

Tab. 4. Fluoreszenzfarben roßfriger Pyroninlösungen nach Pufferung in Abhängigkeit von der Zeit

nach 1 Stunde	reingelbe Fluoreszenz, keine Änderung
nach 2 Stunden	reingelb, aber etwas blasser
nach 3 Stunden	Grundfarbe gelb mit grauen Farbtönen
nach 4 bis 7 Stunden	die gelbe Grundfarbe weicht langsam einem grauweißen Farbton
nach 8 bis 10 Stunden	Fluoreszenz grauweiß. Keine weitere Veränderung Ein ultramarinblauer Farbton wird nicht beobachtet

geringe Farbaufhellung, es liegt jedoch noch die gelbe Kationenfluoreszenz vor. Nach Strugger findet eine relativ schnelle Umfärbung oberhalb von pH 10,3 statt, innerhalb von 20 Minuten wird eine Konstanz der Fluoreszenzfarbe erreicht. Bei meinem Präparat ist innerhalb einer halben Stunde keine Farbänderung zu bemerken. Auch nach Ausschüttelung mit Toluol zeigt dieses nur ganz geringe hellblaue Fluoreszenz, wie sie auch bei reinem Toluol vorkommen kann, besonders wenn als Blindprobe mit Wasser ausgeschüttelt wird. Der Farbumschlag tritt aber ein, sobald man die Lösung wenige Minuten bis zum Kochen erhitzt. Unter der Analysenlampe erscheint ein graues Veil. Die gleiche Farbe weist eine ältere Probe vom Vortage auf.

Bei dem Merckschen Präparat erfolgt die Bildung der blaufluoreszierenden Form also wesentlich langsamer. Um die hierfür notwendige Zeit festzustellen, versetzte ich Pyroninlösungen in einstündigem Abstand mit der gleichen Puffermenge und verglich die Farben unter der Quarzlampe (Tab. 4).

Eine gekochte und eine abgestandene Lösung verhalten sich gleich. Wird mit Toluol ausgeschüttelt, so zeigt dies die schöne ultramarinblaue Fluoreszenz. Vitalfärbungen ergeben die von Strugger beschriebenen Bilder.

Papierchromatographisch wurden im Pyronin zwei Verbindungen nachgewiesen (Drawert 1956). Es war wichtig, festzustellen, welcher der beiden Bestandteile für die blaue Toluolfluoreszenz verantwortlich ist. Durch



Eluieren der einzelnen Farbflecke im Chromatogramm kann die Haupt-(HK) und die Nebenkompente (NK) des Pyronins rein erhalten werden. Die letzte läßt sich auch schneller in größeren Mengen gewinnen, wenn der Farbstoff in einer Zellolosesäule mit absolutem Alkohol behandelt wird. Die HK bleibt stärker adsorbiert, während die NK herausgelöst wird. Die Farbunterschiede der beiden Lösungen gibt Tab. 5 an. Die Konzentrationen sind unbekannt.

Tab. 5. Farbtöne der durch Chromatographie getrennten Komponenten des Pyronins (Merck)

	Tageslicht	Fluoreszenz
Hauptkomponente	himbeerrot	orange
Nebenkompente	hell blaurot	rotorange

In der Elektrophoreseapparatur wandert die HK zur Kathode, mit abnehmender Azidität nur wenig schwächer. Wie bei den meisten basischen Farbstoffen sind, z. T. bedingt durch die Adsorption an die negativ geladenen Gruppen der Zellulose, die zurückgelegten Strecken gering. Jedoch ist bei pH 11,3 innerhalb von 18 Stunden noch eine deutliche Verschiebung zur

Tab. 6. Ausschüttelungsversuche mit Toluol von verschieden vorbehandelten Pyroninlösungen

Art der Behandlung				Fluoreszenz des Toluols
1. unbehandelt				schwach hellblau
2.	gekocht			schwach hellblau
3. + n/10 KOH				wie 2, etwas verstärkt
4. + n/10 KOH	gekocht			intensiv ultramarinblau
5. + n/10 KOH	gekocht	+ n HCl	gekocht	wie 4, etwas milchiger
6.		+ n HCl		gelblich, Eigenfarbe röt.
7.		+ n HCl	gekocht	wie 6

Kathode sichtbar. Die Front des Farbfleckes fluoresziert gelb, woran sich eine lila Übergangszone anschließt. Der Startfleck leuchtet blau auf. Auch hierin macht sich die langsame Umlagerung zur Base bemerkbar.

Die Nebenkompente zeigt ein annähernd gleiches Verhalten. Bei Ausschüttelung mit Benzol geht die NK im neutralen und alkalischen Bereich unter Farbverlust in die organische Phase über.

Eine Fluoreszenz ist nicht sichtbar. Wird dagegen mit HCl stärker angesäuert, ist die NK —vielleicht mit geringen Wasserspuren— im Benzol löslich. Beide Phasen fluoreszieren gelblich.

Die Hauptkomponente zeigt nach Pufferzusatz und Aufkochen den beschriebenen Farbumschlag, sie ist somit für die ultramarinblaue Lipoidfluoreszenz verantwortlich.

Auffällig ist, daß sich die Blaufluoreszenz des Benzols oder Toluols durch Ausschüttelung mit verdünnter Salzsäure nicht wieder entfernen läßt, wie



wir es von den üblichen Farbbasen her kennen. Die wäßrige Lösung bleibt völlig farblos. Es wird vermutet, daß der blauen Pyroninfluoreszenz nicht eine normale Basenbildung zugrunde liegt, sondern bei der Alkalisierung eine irreversible chemische Umlagerung erfolgt.

Weitere Versuche stützen diese Ansicht. Gleiche Mengen Farblösung werden wie folgt behandelt und nach dem Ausschütteln mit Toluol die Fluoreszenzintensitäten verglichen. Die Volumen werden durch Zugabe von Wasser konstant gehalten (Tab. 6).

Ein Aufkochen der reinen Farblösung bewirkt keinerlei Veränderungen. Wie ich schon bei der Ausschüttelung der Nebenkompente im stark sauren Milieu beschrieben habe, ist diese in Spuren mit gelblicher Fluoreszenz in Benzol löslich. Dieser Fall liegt bei 5, 6 und 7 vor.

Auch die milchige Farbe bei Versuch 4 kann darauf beruhen. Wird das Toluol wiederholt mit schwach angesäuertem Wasser ausgeschüttelt, so verschwindet die weißlich-gelbe Überlagerung, und die ultramarinblaue Fluoreszenz unterscheidet sich nicht von Punkt 4.

Bei der Behandlung einer Pyroninlösung mit Alkalien finden irgendwelche Veränderungen des Farbstoffmoleküls statt, die sich auch nach starker Ansäuerung als nicht reversibel erweisen.

Hiermit stehen gewisse Beobachtungen Struggers (1941, S. 124 f.) in Zusammenhang, die ich als solche bestätigen kann, ohne mich den Schlußfolgerungen anzuschließen. Der Autor geht der Frage nach, ob sich innerhalb kurzer Färbzeiten ein Einfluß des Außenpuffers auf die Aziditätslage der Plasmaeiweiße bemerkbar macht. Er färbt Zwiebel-Oberepidermen in schwach sauren Lösungen und überträgt diese dann in einen farblosen Puffer von pH 11,25. Innerhalb von 20 Minuten bleibt die gelbe Kationenfluoreszenz völlig erhalten. Das Plasma nimmt erst nach einer Stunde eine blaugraue Färbung an, in Verbindung mit nekrotischen Veränderungen, die durch den hohen pH-Wert bedingt sind. Bei dem von mir untersuchten Farbstoff brauchen diese Erscheinungen nicht mit einem Nichteindringen des Puffers in die Plasmaphasen in Zusammenhang zu stehen, da der Farbumschlag *in vitro* auch erst nach mehreren Stunden erfolgt. Ferner berichtet Strucker von Versuchen in umgekehrter Reihenfolge. Zellen mit blau fluoreszierenden Protoplasten werden in saure Puffer überführt, ohne daß eine Kationenfluoreszenz bemerkbar wird. Meine Versuche können hierfür eine Erklärung bieten. Auch in Modellversuchen erfolgt keine sekundäre Farbstoffverschiebung. Somit können auf Grund der Pyronin-Vitalfärbungen keine Aussagen über das Eindringen oder Nichteindringen von Pufferlösungen in die Eiweißkomponenten des Plasmas gemacht werden.

## B. Untersuchungen über die UV-Strahleneinwirkung bei Pyroninfärbungen

Die Beobachtungen Struggers (1941) über die Umwandlung der blaufluoreszierenden Pyroninphase zum Kation im UV-Licht sind schon anfangs erwähnt worden. Die Versuche am Gelatine-Benzol-Modell wurden mit gepufferten und gekochten Pyroninlösungen wiederholt und können bestätigt werden. Nach einigen Sekunden verlöscht die ultramarinblaue Fluoreszenz der Benzoltröpfchen, und in der Gelatine breitet sich ein deutlich fluoreszierender Hof aus. Strucker gibt die Farbe mit einem hellen

Grüngelb an. Ähnliche Farbtöne beschreibt er auch an fixierten Zellen. Bei meinen Versuchen tritt eine hellblaue Fluoreszenz auf. Störend wirkt sich hier die gelbe Eigenfluoreszenz der Gelatine aus, außerdem liegt noch eine schwache Kationenfärbung vor, die eine genaue Farbbestimmung unmöglich macht. Die Durchmischung von Gelatine mit bereits blau fluoreszierendem Benzol oder Paraffinum liqu., welches nicht so leicht flüchtig ist, bringt keine eindeutigen Ergebnisse. Die Versuchsanordnung wird deswegen dahingehend modifiziert, daß auf einen hohlgeschliffenen Objektträger ein vorbehandelter Benzoltropfen mit Wasser zusammengebracht wird. Nach Auflegen eines Deckgläschens ist der fluoreszierende Benzoltropfen von farblosem Wasser umgeben. Bringt man das Präparat unter das Mikroskop, so zeigt sich an der von den Strahlen getroffenen Stelle gleichzeitig mit dem Fluoreszenzverlust der organischen Phase die Ausbreitung eines hellblau aufleuchtenden Stoffes im Wasser. Dieser Vorgang ist irreversibel. Der „Erholungsgang“ am Gelatine-Modell muß demnach so verstanden werden, daß in der Gelatine noch vorhandene unveränderte Basenmoleküle nach einiger Zeit in das lipophile Medium eindiffundieren und sich dort anreichern. Nach Strugger ist die Erholungszeit von der Dauer der Einstrahlung abhängig. Nun wird aber nicht nur der Benzoltropfen vom UV-Licht getroffen, sondern das gesamte Blickfeld, so daß auch in der Gelatine vorliegende Basenmoleküle zerstört werden. Ein längerer Diffusionsweg ist die Folge.

Die Einwirkung kurzweiliger Strahlen auf den blau fluoreszierenden Pyroninkörper führt nicht zu einer Umwandlung zum Farbsalz oder Kation, sondern zu einer irreversiblen chemischen Veränderung.

Wenn man voraussetzt, daß das Präparat von Hollborn die gleiche Verunreinigung wie der Mercksche Farbstoff enthält, kann eine Erklärung für die bei Strugger erwähnten gelben und gelbgrünen Farbtöne gegeben werden. Vitalfärbungen mit der isolierten Nebenkompente führen zu gelblich-braunen Plasma- und Kernfluoreszenzen. Diese werden bei Färbung mit dem ungereinigten Pyronin zunächst durch die intensive Blaufluoreszenz überdeckt; erst wenn diese durch die Strahlenwirkung abgeschwächt ist, erscheinen grünliche oder gelbe Farbtöne.

Wie beim Neutralrot nahm ich auch hier Bestrahlungen im größeren Umfang vor. Eine gekochte alkalische Farblösung wurde mit Toluol ausgeschüttelt, dieses dann abgetrennt und in der Hitze eingeeengt. Dabei verschwand die ultramarinblaue Fluoreszenz, die beim Abkühlen jedoch wieder in der alten Stärke erschien. Wie wir gesehen haben, ist nach dieser Behandlung auch die Nebenkompente im Toluol enthalten. Diese läßt sich mit schwach angesäuertem Wasser nur zum Teil ausschütteln. Wie papierchromatographisch festgestellt wurde, kann sie aber quantitativ entfernt werden, wenn man das Toluol mit wasserfreiem Kupfersulfat behandelt. Dabei findet wahrscheinlich eine Adsorption zusammen mit geringen Wasserspuren statt. Das Kupfersulfat färbt sich violett. Nach Filtration ist die Lösung völlig farblos.

Das so gereinigte Toluol wurde dem Quecksilberdampflicht ausgesetzt. Schon nach 3 bis 5 Minuten schlug die ultramarinblaue Fluoreszenz in eine weißlich-hellblaue um, während sich eine gelbliche bis hellbraune Eigenfarbe

zeigte. Durch Ausschütteln mit dest. Wasser konnte die gelbe, hellblau fluoreszierende Bestrahlungskomponente rein erhalten werden. Das chromatographische Bild ist in Abb. 9 wiedergegeben.

Das Photoderivat weist rein hydrophile Eigenschaften auf. Durch Änderung des pH-Wertes der Lösung gelang es nicht, die Verbindung wieder in ein hydrophobes organisches Lösungsmittel zu überführen. In der Elektrophoreseapparatur wurde nach 20 Stunden keinerlei Wanderung festgestellt, was auf das Fehlen einer Ladung deutet.

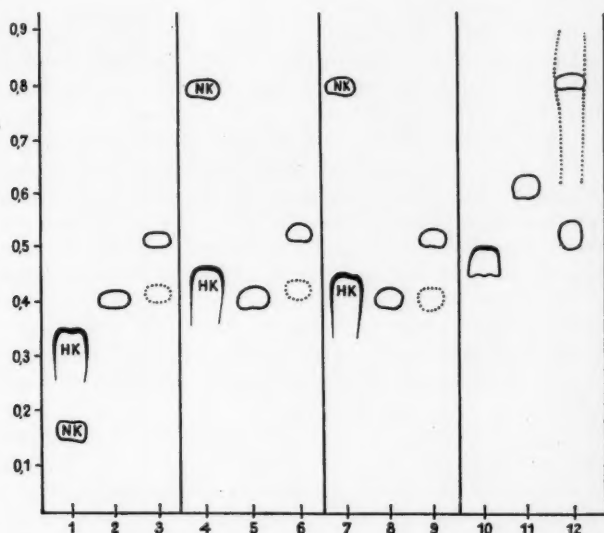


Abb. 9. Papierchromatographische Analyse der Pyroninfarbstoffe (HK = Hauptkomponente, NK = Nebenkompente). 1 = Pyronin (Schuchardt), 2 = Xanthon, 3 = Bestrahlungskomponente, 4 = Akridinrot (Grübler), 5 = Xanthon, 6 = Bestrahlungskomponente, 7 = Pyronin (Merck), 8 = Xanthon, 9 = Bestrahlungskomponente, 10 = Pyronin B (echt stand. Bayer), 11 = Xanthon, 12 = Bestrahlungskomponente.

Im Gegensatz zu der Strahleneinwirkung beim Neutralrot findet die Umwandlung zur hydrophilen Form bei Pyronin auch unter Sauerstoffabschluß statt. Eine nähere Angabe über die Art der Reaktion kann hier nicht gegeben werden. Sie muß chemischen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Eine gewisse Übereinstimmung findet sich noch mit dem unbehandelten lipophilen Stoff. Wenn man das blau fluoreszierende Toluol mit wenig Eisessig versetzt, so schlägt die Fluoreszenz in ein helles Grün um. Wird die hydrophile Komponente angesäuert, verändert sich die Farbe ebenso von Hellblau nach Grün. Beide Vorgänge sind reversibel, sobald die Säure wieder entfernt wird.

Bei Vitalfärbungen an Zwiebelzellen mit dem wasserlöslichen Stoff leuchten im Fluoreszenzmikroskop (UV als Erregerlicht) Zellkerne und Plasma diffus hellblau, im Blaulicht werden gelbliche Farbtöne beobachtet.

### C. Untersuchungen über die ultramarinblaue fluoreszierende „Farbbase“

Auf das merkwürdige, im Gegensatz zu vielen anderen basischen Farbbasen stehende Verhalten der von Strugger (1941, 1947, 1949) und Perner (1952) als lipophil und ultramarinblau fluoreszierend beschriebenen Pyroninbase habe ich schon hingewiesen. Es wurde vermutet, daß es sich bei dem nur langsam verlaufenden Prozeß der Umfärbung, welcher durch Aufkochen beschleunigt werden kann, um eine irreversible Veränderung handeln könnte. Aufschlußreich sind die Untersuchungen von Biehringer (1896), der auf die hohe Empfindlichkeit des Pyronins hinweist: „Bei der Behandlung des Tetramethyldiamidophenylmethans mit conc. Schwefelsäure, bei der Oxydation der Anhydrobase durch unorganische Mittel, beim Kochen der Farbstoffbase mit Salzsäure, selbst beim Ausfällen derselben aus saurer Lösung durch Alkali, entsteht in sehr geringer Menge ein Nebenprodukt, welches den Lösungen der genannten in Säuren nach starker Verdünnung durch Ausschüttelung mit Äther oder Chloroform entzogen werden kann. Setzt man zu der farblosen ätherischen Lösung etwas Alkohol, so zeigt dieselbe eine prächtig blaue Fluoreszenz, welche auf Zusatz von Eisessig in eine fast ebenso intensive grüne Fluoreszenz umschlägt.“

Dieses Nebenprodukt entsteht beim Behandeln mit Alkalien nur in sehr geringer Menge. Durch Zusatz von Oxydationsmitteln wie z. B. rotem Blutlaugensalz gelingt es Biehringer, die Ausbeute des fluoreszierenden Körpers auf 10% zu steigern. Er identifiziert ihn als Tetramethyldiamidoxanthon. Die Reaktion ist nur in alkalischer Lösung möglich, da hier die freie Carbinolgruppe vorhanden ist, während in saurem Milieu durch die Salzbildung eine Oxydation verhindert wird.

Die Versuche wurden teilweise mit dem Präparat von Merck wiederholt. Nach Zugabe von rotem Blutlaugensalz wurde eine verstärkte Xanthonbildung beobachtet.

Noch bessere Ergebnisse konnte ich aber erzielen, wenn ich zu der alkalisierten Lösung einige Tropfen konz.  $H_2O_2$  hinzugab und aufkochte. Die Farbe hellte sich stark auf. Der noch zu bemerkende gelbrosa Farbton war durch die Anwesenheit der Nebenkompente bedingt. Verwendete ich den gereinigten Farbstoff, so entfärbte sich die Lösung vollständig. Beim Abkühlen fiel das Xanthon in feinen weißen Flöckchen aus und konnte rein erhalten werden. Auf diese Weise standen für die Bestrahlung konzentrierte Lösungen zur Verfügung.

Wie eine chromatographische Analyse ergibt (Abb. 9), läßt sich auch bei anderen Fabrikaten die Oxydation zum Xanthon durchführen. Das Pyronin von Schuchardt zeigt einen sehr geringen  $R_f$ -Wert. Der ultramarin-

blau fluoreszierende Fleck des Oxydationsproduktes liegt aber ungefähr auf gleicher Höhe wie das Xanthon des Merckschen Präparates. Die Depression könnte durch die Anwesenheit eines anderen anorganischen Fremdsalzes bedingt sein. Abgesehen von der stark lipoidlöslichen gelben Nebenkomponte ist das Verhalten dieses Farbstoffes dem oben geschilderten ähnlich. Nach alkalischer Pufferung bildet sich kein Niederschlag.

Auf die Übereinstimmung zwischen Akridinrot (Grübler) und Pyronin (Merck) ist schon hingewiesen worden. Auch die Xanthone und die hydrophilen Bestrahlungsprodukte zeigen im Chromatogramm ein gleiches Verhalten. Bei der Ausschüttelung des bestrahlten Toluols oder Benzols mit destilliertem Wasser gehen auch geringe Mengen des unveränderten Xanthons mit in dieses über. Besonders bei erhöhter Temperatur ist das Oxydationsprodukt z. T. in Wasser löslich.

Beim Tetraäthyldiaminoxanthyliumchlorid (Pyronin B echt stand. Bayer) erfolgt die Bildung des Xanthons wesentlich schneller und leichter. Nach Pufferung fällt diese Base als dunkelvioletter Niederschlag sofort aus (Tab. 3), die wäßrige Lösung fluoresziert augenblicklich blau. Mit Benzol und Toluol läßt sich das Oxydationsprodukt zusammen mit einem Teil der Base ausschütteln. Die Konzentration in der organischen Phase ist so stark, daß die Fluoreszenz dadurch abgeschwächt wird und erst nach Verdünnung mit reinem Benzol zur Geltung kommt. Auch hier läßt sich der Farbstoff durch  $H_2O_2$  quantitativ zum ungefärbten Xanthon umwandeln. Der  $R_f$ -Wert ist wesentlich höher (Abb. 9). Die Strahlenempfindlichkeit des Tetraäthyldiaminoxanthons ist erheblich geringer. Bei der Betrachtung eines Benzoltropfens unter dem Mikroskop dauert es einige Minuten, bis sich die Ausbreitung eines hellblau fluoreszierenden Stoffes im umgebenden Wasser bemerkbar macht. Zu einer völligen Fluoreszenzlöschung des Benzols kommt es hier nicht. Das durch Ausschüttelung mit Wasser gewonnene Bestrahlungsprodukt enthält keine Spuren des unveränderten Xanthons, die sich chromatographisch nachweisen lassen. Auffällig ist ein ultramarinblau fluoreszierender Farbfleck in der Höhe der Bestrahlungskomponenten der anderen untersuchten Präparate. Weiter oben leuchtet eine lang ausgezogene Fahne unter der Quarzlampe hellblau auf.

Durch die substituierten Äthylgruppen besitzt das Xanthon des Pyronin B eine stärkere Lipophilie, die sich in dem höheren  $R_f$ -Wert ausdrückt, ebenso in der geringen Löslichkeit in Wasser. Damit stimmen die Befunde bei Vitalfärbungsversuchen überein. Obwohl durch alkalische Pufferung eine starke Xanthonbildung eintritt, kann nur eine sehr schwache Plasmafluoreszenz beobachtet werden. Auch bei Annahme eines reinen Lösungsvorganges in den lipoiden Phasen des Plasmas scheint eine gewisse Hydrophilie des Stoffes notwendig zu sein, damit es zu einer Aufnahme in die lebende Zelle kommt. Die Fluoreszenz ist hier gegen UV-Strahlen wesentlich beständiger.

Zu den Angaben von Strugger (1941, 1947, 1949), Boerner (1950, 1952) und Perner (1952) muß also nach meinen Befunden gesagt werden, daß das Pyronin (Merck) keinen zweifarbigen Fluoreszenzindikator darstellt. Die blaue Fluoreszenz, die bei der Behandlung des Farbstoffs mit basischen Pufferlösungen beobachtet wird, ist nicht auf die Pyroninbase zurückzuführen. Unter diesen Bedingungen findet in geringen Mengen eine Oxydation der Carbinolbase zum Xanthon statt.

### III. Das Verhalten von Janusgrün B im kurzwelligen Licht

Meine Untersuchungen haben gezeigt, welche Veränderungen während der fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung an den Farbstoffen auftreten können, besonders bei Verwendung der starken Quecksilberdampflampen als Strahlenquelle. Es wird in Zukunft nötig sein, noch weitere Farbstoffe auf ihre Strahlenfestigkeit zu prüfen, ehe man aus den mikroskopischen Befunden Rückschlüsse auf die in den jeweiligen Speicherorten vorliegenden Verhältnisse ziehen kann. So berichten Drawert (1953) vom Berberinsulfat und Kuttig (1957) von verschiedenen Triphenylmethanfarbstoffen, daß sich erst unter der Mithilfe der Strahlenwirkung eine Fluorochromierung der Sphärosomen erzielen läßt, wobei auch Reduktionsprozesse eine Rolle spielen. Das Verhalten von Janusgrün B bei der Vitalfärbung von Zwiebelepidermen ist von Drawert (1953) eingehend studiert worden, so daß hier keine näheren Angaben gemacht zu werden brauchen. Dort finden sich auch weitere Literaturangaben über die Verwendung dieses vor allem zum Nachweis der Chondriosomen häufig benutzten Farbstoffes, ebenso Angaben über die Löslichkeitsverhältnisse der verschiedenen Reduktionsformen und das etwas unterschiedliche Verhalten einzelner Farbstofffabrikate.

Für meine Untersuchungen benutzte ich hauptsächlich das Janusgrün B (IG), als Objekt dienten wieder die *Allium*-OE-Zellen. Beobachtet man ein mit Janusgrün 1 : 10 000 in Leitungswasser angefärbtes Epidermishäutchen wenige Minuten nach Deckglasabschluß (Umrandung mit Vaseline) im Fluoreszenzmikroskop mit dem Licht eines Kohlebogens, so ergeben sich die von Drawert (1953) beschriebenen Bilder: während der Wundrand meist eine mehr oder weniger starke Schädigung zu erkennen gibt, lassen sich, in den zentralen Zellen beginnend, die Sphärosomen durch ihre elektive grünlich-gelbe Fluoreszenz nachweisen. Die Intensität ist von der Dauer des Deckglasabschlusses abhängig.

Wird dagegen die intensive Strahlung einer Quecksilberhöchstdrucklampe zur Fluoreszenzanregung benutzt, so ergibt sich bei der mikroskopischen Betrachtung ein verändertes, nicht exakt beschreibbares Bild. Besonders in dem zentralen Bereich des Epidermishäutchens läßt das Plasma eine zuerst dunkelorange, sich schnell zu einem reinen Gelb verstärkende Fluoreszenz erkennen. Der Vorgang verläuft mit solcher Geschwindigkeit, daß nicht sicher zu entscheiden ist, ob eine schwache Fluoreszenz bereits primär vorliegt oder ob sie erst durch die Einwirkung der kurzwelligen Strahlen hervorgerufen wird. Man vergleiche hierzu auch die Untersuchungen von Kärber (1958, S. 81). Während anfänglich die Sphärosomen noch gelblich durch die orangerote Fluoreszenz der Plasmagrundsubstanz hindurchleuchten, wird nach wenigen Sekunden alles gelb überstrahlt. Wie das Plasma verhält sich auch der zuerst schwach purpurrot erscheinende Kern. Durch Zuführung von  $H_2O_2$ -haltigem Wasser erfolgt keine Veränderung des Farbbildes.

Im Zusammenhang mit der von Drawert (1953) beobachteten Fluorochromierung der Sphärosomen mit der reduzierten, farblosen Form des



Janusgrüns und der Möglichkeit, durch eine UV-Bestrahlung die Reduktion eines Farbstoffes herbeizuführen oder zu beschleunigen, war es von Interesse zu prüfen, ob sich die Fluoreszenzveränderung vitalgefärbter Zellen, ebenso wie bei Neutralrot oder Pyronin auf eine Umwandlung des Farbstoffes zurückführen läßt.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung abgestorbener oder fixierter Zellen sind die beschriebenen Phänomene nicht zu beobachten, die Lebenstätigkeit des Gewebes ist von entscheidender Bedeutung hierfür.

Janusgrün ist ein Azofarbstoff, der durch Diazotierung von Diaethylsafranin und Kuppelung mit Dimethylanilin gebildet wird. Bei der Reduktion müssen zwei verschiedene Stufen unterschieden werden: eine rot gefärbte Form, die durch eine irreversible Abspaltung von p-Dimethylaminanilin entsteht und ein unsymmetrisches Diaethylsafranin darstellt, und die farblose Leukoverbindung dieses Safranins. Diese beiden Reduktionsschritte werden auch von der lebenden Zelle ausgelöst, sobald durch Deckglasabschluß der Sauerstoffgehalt verringert wird.

Zur Klärung der oben beschriebenen Erscheinungen mußten wieder Modellversuche durchgeführt werden, und zwar waren alle drei möglichen Formen, das Janusgrün, das Diaethylsafranin und dessen Leukoverbindung, auf ihr Verhalten im kurzwelligen Licht zu prüfen.

1. Janusgrün B (IG, Bayer, Grübler-Berlin-West), Diazingrün (Merck), Janus Green B (N. A. D.), 1 : 10.000 in destilliertem Wasser gelöst, wurden 30 Minuten lang mit der Quecksilberhöchstdrucklampe bestrahlt. Es war keinerlei Veränderung zu beobachten. Auch im Chromatogramm verhielten sich bestrahlte und unbestrahlte, nur erwärmte Lösungen gleich.

2. Diaethylsafranin: Die gleiche Lösung wie unter 1 wurde mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  reduziert. Nach einer anfänglichen völligen Entfärbung kehrt beim Schütteln an der Luft rasch die rote Farbe der 1. Reduktionsstufe wieder. Durch Erwärmen konnte dieser Vorgang beschleunigt und wohl auch vervollständigt werden. Nach der gleichen Bestrahlung wie oben war keinerlei Beeinflussung des Farbstoffes zu bemerken.

3. Leukosafranin: Durch einen Überschuß des zugesetzten Reduktionsmittels ließ sich die Janusgrünlösung bis zur farblosen Stufe reduzieren, ohne daß sofort wieder eine Reoxydation erfolgte. Um diese während der Bestrahlung zu verhindern, wurde unter Stickstoff gearbeitet. Reduktionen mit Dithionit oder Wasserstoff bei Anwesenheit von Palladium verhielten sich gleich. Die 2. Reduktionsstufe ist völlig farblos, unter der Analysenlampe zeigt sie eine etwas schmutzig-grünliche Fluoreszenz. Bei der Verwendung von Dithionit bildet sich ein flockiger Niederschlag. Wird die Lösung nun in den Strahlengang gebracht, so erscheint fast augenblicklich eine intensive reingelbe Fluoreszenz an den Stellen, die von den Strahlen getroffen werden. Während beim Neutralrot der Brenner HBO 74 nur schwache Wirkung hervorrief, ist die Fluoreszenzveränderung und -verstärkung hier bereits unter der Analysenlampe während kurzer Beobachtungszeiten sichtbar.

Die Modellversuche geben eine Erklärung für die mikroskopischen Befunde. Das Janusgrün und das Diaethylsafranin werden von den Strahlen nicht verändert, wohl aber die Leukoverbindung. In toten Zellen kann

die Reaktion nicht ausgelöst werden, erst wenn es durch die Lebenstätigkeit der Zelle bei Sauerstoffmangel zu einer völligen Reduktion des Farbstoffes gekommen ist, erscheint unter der Strahleneinwirkung die intensive gelbe Fluoreszenz.

Wird die bestrahlte Lösung an Luft gut durchgeschüttelt, so findet je nach dem Anteil des veränderten Farbstoffes wieder eine Umfärbung nach Gelblich-Rosa oder Rot statt. Durch Ausschütteln mit Chloroform kann ein Teil des Safranins entfernt werden (Drawert 1953); dies gelingt noch besser, wenn die völlig reduzierte Form ausgeschüttelt wird, da diese sich durch stärkere Lipophilie auszeichnet. So ließ sich eine fast reingelbe Lösung

gewinnen. Das chromatographische Verhalten der Bestrahlungskomponente ist aus Abb. 10 ersichtlich.

Janusgrün B (IG) enthält stets auch einen geringen Anteil des Safranins. Die bei Bestrahlung der Leukoverbindung entstehende gelb fluoreszierende Komponente zeichnet sich durch einen höheren  $R_f$ -Wert aus. Daneben wird bei der belichteten Lösung gelegentlich noch ein schwach grünlich aufleuchtender Fleck wahrgenommen. Dieser wird auch bei einer im reduzierten Zustand bestrahlten Safranin T-(Merck)-Lösung beobachtet, bei der sich

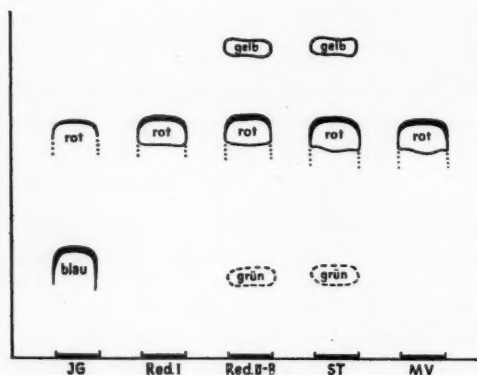


Abb. 10. Papierchromatographische Analyse von Janusgrün B, JG = Janusgrün B unbehandelt, Red. I = 1. Reduktionsstufe (Diaethylsafranin), Red. II-B = Reduktionsstufe bestrahlt, ST = Safranin T, reduziert und bestrahlt, MV = Methylenviolett (Hollborn u. S.).

in gleicher Weise das stark fluoreszierende Produkt bildet. Zum Vergleich wurden noch andere Safraninfarbstoffe mit herangezogen, so das Safranin O (Chroma), Methylenviolett (Hollborn & Söhne — nach den Farbstofftabellen von Schultz Nr. 959 handelt es sich um das Dimethyldiaminophenosafranin), Methylenviolett stand. (Bayer — der Farbstoff wird von der Firma als Diaethylphenosafranin bezeichnet), und das Phenosafranin stand. (Bayer). Auch bei diesen, soweit es sich chromatographisch feststellen läßt, wohl teilweise einander identischen Farbstoffen kann die Entstehung eines intensiv fluoreszierenden Stoffes durch die Strahlenwirkung festgestellt werden.

In der Elektrophoreseapparatur wandert die gelbe Komponente stärker als das Janusgrün oder die 1. Reduktionsstufe zur Kathode, im Bereich von pH 3,5–10,3 annähernd im gleichen Maße.

Während beim Neutralrot eine photooxydative Zerstörung nachgewiesen werden konnte, handelt es sich hier möglicherweise um eine intramolekulare

Veränderung, da der Farbstoff außerordentlich labil ist. Es gelang nicht, ihn rein darzustellen. Bei Erwärmung schlägt die Farbe wieder nach Rot um, und im Chromatogramm ist dann kein Unterschied zur 1. Reduktionsstufe (= Diaethylsafranin) zu beobachten. Dasselbe geschieht beim Einengen im Vakuum. Die Zeit bis zum Farbumschlag ist stark vom pH-Wert der Lösung abhängig, am längsten ist die gelbe Verbindung zwischen pH 4,5 und 6 haltbar. Zugabe von  $H_2O_2$  bewirkt auch hier, wie bei vitalgefärbten Zellen, keine Beschleunigung des Vorganges.

Vitalfärbeversuche lieferten keine eindeutigen Ergebnisse, da der Farbstoff nicht rein vorlag. Eine intensive gelbe Fluorochromierung der Membranen war zu beobachten, das Plasma verhielt sich unterschiedlich in der Anfärbung, gelegentlich trat eine starke Aufquellung ein, wobei sofort intensiv gelb fluoreszierende Granula zu sehen waren, deren Fluoreszenz aber fast augenblicklich wieder gelöscht wurde. Die Kerne, ebenfalls meist stark aufgequollen, leuchteten gelb auf, die Nukleolen schienen farblos zu sein. Auch hier wurde die Fluoreszenz innerhalb von 20 bis 60 Sekunden wieder gelöscht.

### Zusammenfassung

Die basischen Vitalfarbstoffe Neutralrot, „Fluoreszent X“ (reduziertes Neutralrot) sowie Pyronin und Janusgrün B werden auf ihr Verhalten im kurzwelligen Licht untersucht.

Ergänzend zu den Befunden von Drawert und Metzner (1956), nach denen unter der Einwirkung des Erregerlichtes eines Fluoreszenzmikroskopes aus dem kationischen Neutralrot ein grün fluoreszierender, negativ geladener Körper entsteht, wird festgestellt, daß es sich hierbei um eine photooxydative Zerstörung des Farbstoffes handelt. Dieser Vorgang ist an die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff gebunden.

Nur die Farbbase ist strahlenempfindlich. Wird diese in Toluol oder anderen lipophilen neutralen Reagenzien gelöst und dem Licht einer Quecksilberhochdrucklampe ausgesetzt, so entstehen mindestens sieben verschiedene grünlich bis gelblich fluoreszierende Verbindungen. Mit Hilfe der Papierelektrophorese läßt sich eine gute Trennung erzielen. Auf Grund von Lösungsunterschieden können aus dem Reaktionsgemisch eine gelb fluoreszierende, in saurer Lösung lipoidlösliche Komponente und eine extrem hydrophobe Verbindung von den wasserlöslichen Anteilen isoliert werden.

Bestrahlt man den Farbstoff in gepufferten wäßrigen Medien, entstehen bei der Elektrophorese sich abweichend verhaltende Zersetzungsprodukte. Auf die mögliche Bedeutung dieser Erscheinung für die Analyse der Vitalfluorochromierung wird hingewiesen.

Bei einer weiteren Einwirkung des energiereichen Lichtes zersetzen sich die grün fluoreszierenden Zwischenprodukte weiter zu farb- und fluoreszenzlosen Verbindungen.

Infolge der intensiven Fluoreszenz der anionischen Komponenten können in der pflanzlichen Zelle noch geringste Spuren von Neutralrot nachge-

wiesen werden, auch wenn im Hellfeld keine Rotfärbung zu erkennen ist.

Die Auslösung einer sekundären Fluoreszenz in den „leeren“ Vakuolen der oberen Zwiebelepidermis bei pH 5 läßt auf eine Permeation der Farbbase schließen, ohne daß es hier jedoch zu einer stärkeren Speicherung kommt.

Die Verteilung der Farbstoffe Neutralrot, Akridinorange und Thionin zwischen einer wäßrigen Phase und Benzol in Abhängigkeit von der Azidität wird photometrisch quantitativ gemessen. Die Verteilungsgleichgewichte der drei Farbstoffe stehen nicht in direktem Zusammenhang mit dem Verlauf ihrer Dissoziationskurven. Es läßt sich zeigen, daß die Größe der maximalen Lipoidlöslichkeit hierbei von entscheidendem Einfluß ist. Diese wird für Neutralrot, Akridinorange und Thionin bestimmt.

Nach den Befunden kann die Aufnahme der Farbstoffe auf Grund ihrer Lipoidlöslichkeit erklärt werden, ohne daß nichtosmotische oder metaosmotische Aufnahmeprozesse angenommen werden müssen. Über die Speicherungsprozesse werden dabei keine Aussagen gemacht.

Die reduzierte Form des Neutralrots zeigt bei Gegenwart von Sauerstoff ebenfalls eine Reaktion im kurzwelligen Licht. Die intensive Fluoreszenz wird dabei vernichtet, eine Reoxydation zum Neutralrot findet aber wahrscheinlich nicht statt. Die Aufnahme des Farbstoffes wird durch die Lipophilie der Leukobase ermöglicht, die sich unter völligem Farbverlust in neutralen hydrophoben Medien löst.

Die verschiedenen Pyroninpräparate des Handels weichen in ihren chemischen Eigenschaften und Reinheitsgraden stark voneinander ab. Dadurch lassen sich manche Widersprüche in der Literatur erklären.

Die ultramarinblaue Fluoreszenz basischer Pyroninlösungen ist nicht auf die Pyroninbase zurückzuführen. Bei der Behandlung des Farbstoffes mit Alkalien erfolgt in geringer Menge die Oxydation des Xanthenderivates zum lipophilen Xanthon. Diesem kommt die intensive Fluoreszenz zu. Durch Säurezugabe ist dieser Prozeß nicht umkehrbar. Besonders das Xanthon des Tetramethyldiaminoxanthylumchlorids (Pyronin G) erweist sich in höchstem Maße als strahlenempfindlich.

Der Azofarbstoff Janusgrün B und seine rote Reduktionsstufe (Diaethylsafranin) sind im kurzwelligen Licht weitgehend beständig. Die zweite, farblose Reduktionsform (Leukosafranin) zeigt eine äußerst schnelle Strahlenreaktion. Dabei entsteht eine labile gelb fluoreszierende Verbindung, die durch  $H_2O_2$  nicht verändert wird, sich aber nach einiger Zeit wieder in das rote Safranin zurückverwandelt.

Auf verschiedene in der Literatur beschriebene Reaktionen organischer Stoffe im kurzwelligen Licht wird hingewiesen und auf die Notwendigkeit einer genauen Farbstoffanalyse, ehe sich Schlußfolgerungen aus dem Fluoreszenzbild vitalgefärbter Objekte ziehen lassen.

Die Arbeit wurde auf Anregung von Herrn Professor Dr. H. Drawert durchgeführt, dem ich auch an dieser Stelle für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und für die fördernde Anteilnahme am Fortgang der Untersuchungen Dank sage.

## Literatur

- Bachér, F., 1929: Chemische Reaktionen organischer Körper im ultravioletten Licht und im Licht der Sonne. In: *Abderhalden, Handb. biol. Arbeitsmethoden*, Abt. I, T. 2 II 1, 3, 1359.
- Bartels, P., 1954: Quantitative mikrospektrographische Untersuchung der Speicherungs- und Permeabilitätsverhältnisse akridinorangegefärbter Zellen. *Planta* 44, 541.
- 1956 a: Spektralphotometrische Untersuchungen am Neutralrot (I). Prototropie-Gleichgewichte und Normaltemperaturspektren im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich. *Z. phys. Chem.* 9, 74.
- 1956 b: Spektralphotometrische Untersuchungen am Neutralrot (II). Das Assoziationsverhalten in wäßriger Lösung. *Z. phys. Chem.* 9, 95.
- und H. O. Schwantes, 1955: Quantitative mikrospektrographische Messungen zur Aufnahme von Thionin durch lebende Zellen von *Allium cepa*. *Z. Naturforsch.* 10 b, 712.
- — 1957: Mikrospektrographische Messungen zur Aufnahme und Speicherung von Neutralrot durch lebende Zellen von *Allium cepa*. *Planta* 50, 1.
- Bazin, S., 1946: Influence de la constitution chimique de divers colorants sur leur pénétration dans la cellule vivante de *Chara*. *C. r. soc. biol.* 140, 210.
- Biebl, R., 1942 a: Wirkung der UV-Strahlung auf *Allium*-Zellen. *Protoplasma* 36, 491.
- 1942 b: Wirkung der UV-Strahlung auf die Plasmapermeabilität. *Protoplasma* 37, 1.
- 1947: Strahlenwirkungen auf das pflanzliche Protoplasma. *Mikroskopie* 2, 328.
- und W. Url, 1958: UV-Strahlenwirkung auf Zellen von *Allium cepa*, besonders deren Chondriosomen und Plastiden. *Protoplasma* 49, 529.
- Biehinger, J., 1896: Über die Farbstoffe der Pyroningruppe. *J. prakt. Chem.* 54, 217.
- Bierry, H., V. Henri und A. Ranc, 1910: Einwirkung der ultravioletten Strahlen auf Kohlehydrate. *Chem. Zbl.* 81, II, 1038 (*C. r. d. Acad. Sci.* 151, 316).
- — 1911: Einwirkung der ultravioletten Strahlen auf Glycerin. *Chem. Zbl.* 82, I, 1196 (*C. r. Acad. Sci.* 152, 535).
- Boerner, D., 1950: Fluoreszenzmikroskopische Studien an der Haut. *Mikroskopie* 5, 235.
- 1952: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Lipoiden. *Protoplasma* 41, 168.
- Boerner-Patzelt, D., 1950: Über ursächliche Faktoren der polychromen Fluoreszenz von Geweben und Gewebestrukturen nach Fluorochromierung mit einem Fluorochrom. *Protoplasma* 39, 639.
- Bogen, H. J., und H. Prell, 1953: Messung nichtosmotischer Wasseraufnahme an plasmolysierten Protoplasten. *Planta* 41, 459.
- Brand, V. v., 1955: Chinon und cancerogene Wirkung. *Naturwiss.* 42, 300.
- Bräutigam, F. und A. Grabner, 1949: Fluoreszenzmikroskopie. In: *Beitrag zur Fluoreszenzmikroskopie*. Wien.
- Ciamician, G., und P. Silber, 1912: Chemische Lichtwirkungen. XXII. Autoxydationen I. *Ber. dtsh. chem. Ges.* 45, 38.
- — 1913: Chemische Lichtwirkungen. XXVI. Autoxydationen VI. *Ber. dtsh. chem. Ges.* 46, 417.
- — 1913: Chemische Lichtwirkungen. XXVIII. Autoxydationen VI. *Ber. dtsh. chem. Ges.* 46, 3896.

- Clark, W. M., and M. E. Perkins, 1932: Studies on oxydation-reduction. XVII. Neutral red. J. amer. Chem. Soc. 54, 1228.
- Drawert, H., 1940: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora 134, 159.
- 1941: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. III. Die Aufnahme saurer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora 135, 21.
- 1948: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. V. Zur Theorie der Aufnahme basischer Stoffe. Z. Naturforsch. 3b, 111.
- 1952: Die Eigenfluoreszenz der Schuppenblattepidermis von *Allium cepa* L. und ihre Beeinflussung. Z. Bot. 40, 407.
- 1953: Vitale Fluorochromierung der Mikrosomen mit Janusgrün, Nilblausulfat und Berberinsulfat. Ber. dtsh. bot. Ges. 66, 135.
- 1956: Die Aufnahme der Farbstoffe. Vitalfärbung. In: W. Ruhland: Hb. d. Pflanzenphysiol., Bd. II, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- und H. Gutz, 1953: Zur vitalen Fluorochromierung der Mikrosomen mit Nilblau. Naturwiss. 40, 512.
- und M. Kärber, 1956: Zur Frage der Fluorochromierung von Granula in Hefezellen mit Berberinsulfat. Naturwiss. 43, 161.
- und I. Metzner, 1955: Vitalfluorochromierungen mit Brillantkresylblaupräparaten verschiedener Herkunft. Ber. dtsh. bot. Ges. 68, 385.
- — 1956: Untersuchungen zur vitalen Fluorochromierung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma 47, 359.
- und S. Strüger, 1958: Zur Frage der Methylenblauspeicherung in Pflanzenzellen. Ber. dtsh. bot. Ges. 56, 43.
- Epstein, L. F., F. Karush, and E. Rabinowitch, 1941: A spectrophotometric study of Thionine. J. opt. Soc. Amer. 31, 77.
- Gebhard, K., 1911: Zusammenhang zwischen Lichtempfindlichkeit und Konstitution von Farbstoffen. J. prakt. Chem. 84, 561.
- Glubrecht, H., 1953: Über die Wirkung von UV-Strahlen in somatischen Zellen. Z. Naturforsch. 8b, 17.
- 1956: In: Simonis, W., 1956, S. 674.
- Grün, A., und Th. Wirth, 1920: Über die Oxydation von Paraffin zu Wachs im ultravioletten Licht. Angew. Chem. 33, 291.
- Gutz, H., 1956: Zur Analyse der Granula-Fluorochromierung mit Nilblau in den Hyphen von *Mucor racemosus* Fres. Planta 46, 481.
- 1958: Ergänzende Beobachtungen zur Granulafluorochromierung mit Nilblau in Pilzzellen. Naturwiss. 45, 519.
- Höfler, K., 1947: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? Mikroskopie 2, 13.
- 1948: Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange. S. B. Wien, Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 156, 585.
- 1949: Fluorochromierungsstudien an Pflanzenzellen. In: Bräutigam und Grabner, Beitr. z. Fluoreszenzmikroskopie, Wien.
- 1953: Zur Vital- und Fluoreszenzfärbung. Ber. dtsh. bot. Ges. 66, 454.
- Kärber, M., 1958: Untersuchungen über die granulären Einschlüsse der Hefezelle. Arch. Mikrobiol. 29, 65.
- Kailan, A., 1920: Über Reaktionen der durchdringenden Radiumstrahlung und im Quarzglasultraviolett. Z. phys. Chem. 95, 215.
- Kiermayer, O., 1955: Über die Reduktion basischer Vitalfarbstoffe in pflanzlichen Vakuolen. S. B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 164, 275.



- Kiermayer, O., 1956: Fluorochromierung pflanzlicher Zellen mit Fluoreszent X (reduziertem Neutralrot). *Protoplasma* 46, 437.
- Kinzel, H., 1954: Theoretische Betrachtungen zur Ionenspeicherung basischer Vitalfarbstoffe in leeren Zellsäften. *Protoplasma* 44, 52.
- 1958 a: Metachromatische Eigenschaften basischer Vitalfarbstoffe. (Eine Studie zum cytochemischen Aspekt der Vitalfärbung.) *Protoplasma* 50, 1.
- 1958 b: Referat zu: Bartels und Schwantes, 1957. *Protoplasma* 50, 185.
- Kölbel, H., 1947: Quantitative Untersuchungen über die Farbstoffspeicherung von Akridinorange in lebenden und toten Hefezellen und ihre Beziehung zu den elektrischen Verhältnissen der Zelle. *Z. Naturforsch.* 2 b, 382.
- 1948: Quantitative Untersuchungen über den Speicherungsmechanismus von Rhodamin B, Eosin und Neutralrot in Hefezellen. *Z. Naturforsch.* 3 b, 442.
- Kriegel, H., und L. Herforth, 1957: Über die Einwirkung von langwelligem UV-Licht auf die Fluoreszenz cancerogener Kohlenwasserstoffe in verschiedenen Lösungsmitteln. II. Das Fluoreszenzverhalten der Lösungen bei verschiedenen Bestrahlungsintensitäten. *Z. Naturforsch.* 12 b, 41.
- Küttig, W., 1957: Weitere Beiträge zur Fluorochromierung der Sphärosomen pflanzlicher Zellen mit basischen Farbstoffen. *Protoplasma* 48, 562.
- Lewis, M. R., 1935: The effect of the vital dye fluorescent X (reduced neutral red, Clark) on living chick embryo cells in tissue cultures. *Arch. exper. Zellforsch.* 17, 96.
- Miličić, D., 1957: Vitalfärbungsversuche mit reduziertem Neutralrot an „vollen“ Zellsäften einiger höherer Pflanzen. *Protoplasma* 48, 170.
- Mix, M., 1958: Der Mechanismus der Sphärosomenfluoreszenz mit Oxazinen und anderen basischen Farbstoffen. *Protoplasma* 50, 2.
- Musso, H., 1958: Moderne Trennungsmethoden in der Chemie. *Naturwiss.* 45, 97.
- Perner, E. S., 1952: Zellphysiologische und cytologische Untersuchungen über den Nachweis und die Lokalisation der Cytochrom-Oxydase in *Allium*-Epidermiszellen. *Biol. Zbl.* 71, 43.
- Rabinowitch, E., and L. Epstein, 1941: Polymerization of dyestuffs in solution. Thionine and Methylene Blue. *J. Amer. Chem. Soc.* 63, 69.
- Rein, H., 1954: Neuere Arbeiten über Lichtwirkung auf Farbstoffe. *Angew. Chem.* 47, 157.
- Ruhland, W., 1908: Beiträge zur Kenntnis der Permeabilität der Plasmahaut. *Jb. wiss. Bot.* 46, 1.
- Schultz, G., 1931: Farbstofftabellen, 7. Aufl. Leipzig.
- Sibatani, A., 1952: Differential staining of nucleic acids. I. Methylgreen-Pyronin. *Cytologia* 16, 315.
- and M. Fukuda, 1952: Importance of controlling water content of the solvents for paper chromatographie. *Biochem. (Tokyo)* 38, 181.
- Simonis, W., 1956: Die Wirkung von Licht und Strahlung auf die Zelle. In: Ruhland, W.: *Hb. d. Pflanzenphysiol.*, Bd. II, 655. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Strugger, S., 1940 a: Neues über die Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. *Protoplasma* 34, 601.
- 1940 b: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. *Jena Z. Naturw.* 75, 97.
- 1941: Zellphysiologische Studien mit Fluoreszenzindikatoren. I. Basische, zweifarbige Indikatoren. *Flora* 135, 101.
- 1947: Die Vitalfluorochromierung des Protoplasmas. *Naturwiss.* 34, 267.

- Strugger, S., 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Suida, M., 1912: Monatsh. f. Chem. (Wien) 33, 1277, Zit. nach Bachér, 1929, S. 1475.
- Tappeiner, H., und A. Jodlbauer, 1907: Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme. Dtsch. Arch. klin. Med. 80, 427.
- Toth, A., 1952: Neutralrotfärbung im Fluoreszenzlicht, Protoplasma 41, 103.
- Wuhrmann-Meyer, K. und W., 1941, Untersuchungen über die Absorption ultravioletter Strahlen durch Kutikular- und Wachsschichten von Blättern. Planta 32, 43.
- Wunderly, Ch., 1954: Die Papierelektrophorese. Methoden und Ergebnisse. Aarau und Frankfurt a. M.
- Zanker, V., 1952: Über den Nachweis definierter reversibler Assoziate („reversible Polymerisate“) des Akridinorange durch Absorption- und Fluoreszenzmessungen in wäßriger Lösung. Z. phys. Chem. 199, 225.

# Über den Zustand des Plasmas in vakuolenkontrahierenden *Anchusa*-Zellen

Von

**Franz Enöckl**

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. Januar 1960)

## 1. Einleitung

Nachdem Küster (1927) die spontane Vakuolenkontraktion an *Allium*-Epidermiszellen erstmals beschrieben hatte, entdeckten Gicklhorn und Weber (1927) an den Zellen der Borraginaceenblüten eine ähnliche Erscheinung anderer Art. Brachten diese Autoren Blumenkronzipfel ihrer Hauptversuchspflanze *Echium italicum* in Leitungswasser, so machten sie die Feststellung, daß sich die anthocyanführenden Vakuolen der Mesophyllzellen kontrahierten, wobei ihre Färbung an Intensität zunahm. Die Vakuolen rundeten sich jedoch nicht ab, wie dies bei *Allium*-Zellen der Fall zu sein pflegte, sondern gaben die sternähnliche Zellform verkleinert wieder. Bei diesem Vorgang blieb das unverquollene, wandständige Plasma über, einige Stränge mit der verkleinerten Vakuole in Verbindung. Da an angeschnittenen Wundzellen die in das umgebende Medium ragende Vakuole keineswegs Abrundung zeigte und auch bei Plasmolyse, bei der sich das Plasma der Vakuole anlegte, dem Protoplasten die bizarre Form der Vakuole aufgezwungen wurde, vertraten die Autoren die Meinung, daß es sich hier um einen gallertig festen Zellsaft handeln würde. Eine Wiederausdehnung der kontrahierten Vakuole konnten sie nie beobachten.

Gicklhorn und Möschl (1930) erkannten an epipetalen Schuppen bei *Symphytum officinale*, daß der Zellsaft in unbehandeltem Zustand flüssig, nach Neutralrotfärbung aber verfestigt war.

An Epidermisfragmenten der Blüte von *Anchusa italica* konnte Keil (1930) zeigen, daß die Vakuolenkontraktion auch durch seismische Reizung auszulösen ist, indem sich nach mehreren Klopfstößen auf das Deckglas, unter dem sich das Präparat befand, die Zahl der Zellen mit kontrahierter Vakuole vermehrt hatte.

Wurde von Gicklhorn und Weber betont, daß sie nie eine Diastole beobachten konnten, so gelang es Henner (1934) an *Alkanna tinctoria* und *Anchusa officinalis* die in Leitungswasser eingetretene Vakuolenkontraktion in hyper- und hypotonischen Traubenzuckerlösungen rückgängig zu machen. Bei neuerlicher Wässerung der Blüten stellte sich in den beobachteten Zellen abermals Vakuolenkontraktion gleichen Grades ein.

Nach Weber (1935) läßt sich mit Neutralrotlösung in Leitungswasser sowohl an anthocyanhaltigen Mesophyll- als auch an anthocyanfreien Epidermiszellen der Korollen Vakuolenkontraktion auslösen, die schon nach wenigen Minuten einsetzt und innerhalb einer halben Stunde ihr Maximum erreicht. Das wandständige Plasma zeigt auch hier keinerlei Verquellung. Weber ist nun der Ansicht, daß es sich hier um einen Synäresisvorgang handelt, bei dem sich der Zellsaft in einen wasserärmeren, zentralliegenden, gefärbten Gel-Teil und einen diesen umgebenden, wasserreichen, ungefärbten Sol-Teil scheidet. Es liegt hier demnach keine Vakuolenkontraktion im Sinne Küsters (1927) vor, da der dem Zellsaft zur Verfügung stehende Raum dabei nicht verkleinert wird. Nach vierundzwanzig- bis achtundvierzigstündigem Verweilen in der Farbblösung konnte sich der Solteil dieser Zellen ebenfalls anfärben und bei genügend starker Speicherung unter derselben Entmischung abermals kontrahieren, so daß eine Zonierung der Vakuole zustande kam. Häufiger als jene „zweite Vakuolenkontraktion“ zeigte sich in Webers Versuchen aber „Reizplasmolyse“, bei der sich das Plasma unter Abwesenheit hypertonischer Mittel von der Wand abhob und dem sich kontrahierenden, gefärbten Solteil folgte. Solche Zellen starben jedoch bald ab. Die spätere Anfärbbarkeit des bei der ersten Kontraktion entstandenen Soles und die Plasmolysierbarkeit sind in Webers Augen ein Beweis dafür, daß jener Solteil osmotisch wirksame Substanzen enthält, die im Verlaufe mehrerer Stunden entstehen und eine neuerliche Anfärbung ermöglichen.

Neben jenen Zellen fanden sich aber auch solche, bei denen sich die Vakuole rasch und stark kontrahierte und die Scheidung in Sol- und Gelteil unterblieb, das Plasma aber verquoll und den Raum zwischen Vakuole und Membran erfüllte.

Hofmeister (1940 a) untersuchte an Borraginaceen-Zellen die Zellsaftverfestigung auf mikrurgischem Weg und fand, daß sich die Zellsäfte nach Traubenzuckerplasmolyse verschieden verhielten. In jenen Zellen, in denen der Protoplast runde Form angenommen hatte, blieb der Zellsaft flüssig und floß beim Eröffnen des Protoplasten mit der Mikronadel aus. In jenen Fällen, in denen der Protoplast die Zellform wiedergab, aber nur wenig verkleinert war, zeigte sich, daß die stark blaugefärbte Außenschicht der Vakuole fest, der schwächer gefärbte umschlossene Inhalt aber flüssig war. Waren Plasmolyse und Spontankontraktion aber gekoppelt und der Protoplast stärker kontrahiert als der Plasmolytikumskontraktion entsprach, so lag die Vakuole als durch und durch verfestigter Körper vor, der sich auch nach dem Herausreißen aus der Zelle nicht mehr auflöste.

Bei Plasmolyse in  $\text{KNO}_3$  blieben die Vakuolen stets flüssig, mit  $\text{CaCl}_2$

war immer Verfestigung zu beobachten. In aqua dest. spontan kontrahierende Vakuolen konnten nur äußerlich oder völlig erstarrt sein.

Ließen sich die nur äußerlich verfestigten Vakuolen durch mechanische Insulte wie Quetschen mit der Mikronadel unter Verflüssigung wieder zur Auflösung bringen, so war dies nach Neutralrotfärbung nicht mehr der Fall. Vielmehr zeigten sich diese Vakuolen schneidbar und bei der Berührung mit der Mikronadel als elastische Körper. Hofmeister ist nun der Ansicht, daß es sich bei der Zellsaftverfestigung unter Plasmolyse resp. Spontankontraktion in Wasser und bei Vitalfärbung mit Neutralrot um verschiedene Vorgänge handelt. Im ersten Falle würde eine synäretische Gelkontraktion unter Ausscheidung eines Sols, wie dies Weber angenommen hatte, vorliegen, während die Entmischung bei Neutralrotfärbung einen anderen Vorgang darstellt. Bei Mikroinjektionen von Neutralrot, Methylenblau und anderen Farbstoffen in den flüssigen Zellsaft machte Hofmeister (1940b) nämlich die Beobachtung, daß sich, sobald nur kleine Mengen aus der Mikropipette ausgetreten waren, um deren Öffnung ein gefärbter, fester Klumpen zeigte. Mikrochemische Untersuchungen des Zellsaftes von *Symphytum*, auf Gerbstoffe, Eiweiß und Zellulose fielen negativ, auf Pektinstoffe aber positiv aus. Da es sich außerdem gezeigt hatte, daß Pektinsäure durch basische Farbstoffe ausgefällt werden kann, hält es Hofmeister für wahrscheinlich, daß die Vakuolenkontraktion bei Vitalfärbung einer Fällung von Pektinstoffen gleichkomme.

Nachdem Weber (1935) in konzentriertem Alkohol eine supravitale Vakuolenkontraktion in Blütenzellen auszulösen vermochte, die bei Übertragung in Leitungswasser zurückging, gelang es Kenda und Weber (1952), an Blüten der *Cerithe maior* bei Einwirkung verschiedener Säuren (pH 1—2) eine blitzartig eintretende Vakuolenkontraktion zu induzieren, die bei nachfolgender Behandlung mit Basen wieder verschwand. Weber und Kenda (1953) vermochten an Zellen derselben Pflanze nach spontaner Kontraktion mit verdünnter Schwefelsäure noch eine weitere hervorzurufen. Die Autoren nehmen an, daß für diesen Effekt die makromolekularen Ketten der Pektinstoffe verantwortlich seien.

Während von den bisher genannten Autoren betont wird, daß bei dieser Art von Vakuolenkontraktion das Plasma nicht aufquellte und unbeteiligt an der Membran verharre, stellt dies Küster (1959) auf Grund der Beobachtung des Zustandekommens der Anthocyanophoren bei *Pulmonaria* in Abrede. Er ist vielmehr der Ansicht, daß auch hier das Plasma verquellte, aber dann so stark vakuolisierte, daß es schwerfalle, einen den Gelkörper umgebenden Plasmateil, in dem sich zuweilen noch Plastiden fänden, und die feinen Verbindungsstränge zum wandständigen Plasmateil zu erkennen. Küster (1950) revidiert jedoch nach Untersuchung der Vakuolenkontraktion an mit Aluminiumsulfat gegerbten *Allium*-Protoplasten, bei welcher ebenfalls ein hoher Kontraktionsgrad erreicht wurde, seine Ansicht und schließt sich der Deutung dieses Vorganges als Synärese an.

Da in allen Untersuchungen die Vakuolen stets im Vordergrund des Interesses gestanden hatten, war es eine verlockende Aufgabe, das Plasma näher in Augenschein zu nehmen, um so mehr als Hofmeister, der

dieses Phänomen wohl am eingehendsten studiert hatte, meint: „Eine Entscheidung über die tatsächlichen Verhältnisse wäre nur durch Darstellung der inneren Plasmagrenzschicht ... zu treffen.“ (1940 a, S. 92.) Dies war zu erreichen durch Fluorochromierung mit Uranin, bei der sich hauptsächlich das Binnenplasma anfärbt und die überdies noch den Vorteil bot, Auskunft über den Lebenszustand der Zellen zu bekommen. Nach Döring (1935), Schumacher (1936), Strugger (1938, 1949) und Höfler-Ziegler-Luhan (1956) vermag sich nur lebendes Plasma unter Auftreten einer charakteristischen grünen Plasmafluoreszenz zu tingieren, während totes den Farbstoff nicht mehr annimmt. In weiterer Folge gelang es mir zu zeigen, daß die Uranin-Fluorochromierung eine feinere Lebensreaktion als die Plasmolyse darstellt (1959) und gestattet, verschiedene Nekrotestadien, die durch Ammonkarbonateinwirkung auf *Allium*-Zellen entstanden waren, auseinanderzuhalten (1960, S. 356).

## 2. Material und Methodik

Als Versuchsobjekt dienten die Korollen von *Anchusa officinalis*, die noch am selben Tag, an dem die Pflanzen eingebracht worden waren, der Präparation zugeführt wurden. Dabei kamen nur solche Blüten zur Verwendung, die mit dem Blütenboden noch fest verwachsen waren und mittels Pinzette von diesem losgetrennt werden mußten. Zur Auslösung der Vakuolenkontraktion wurden sie mit einer Neutralrotlösung (1 : 1000 in Leitungswasser) infiltriert und die Interzellularluft mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entfernt. Nach einer Färbedauer von 1 bis 78 Stunden wurden nun dünne Flächenschnitte der beiden Epidermen angefertigt, die zur Darstellung des Plasmas anschließend mit Uranin (Na-Fluorescein) 1 : 10 000, pH 4,8 fünf Minuten lang gefärbt wurden. Nach tüchtigem Auswaschen der Schnitte in gleichnamigen, verdünntem Puffer erfolgte die Beobachtung im Reichertschen UV-Mikroskop.

Als Plasmolytikum dienten Traubenzuckerlösungen, die mit aqua dest. hergestellt worden waren.

## 3. Beobachtungen an Zellen der oberen Epidermis

### a) Zellen mit unverändertem Plasma

Die Zellen der oberen Epidermis sind durch papillöse Gestalt und geringen Anthocyanbesitz ihrer Vakuolen charakterisiert und zeigen im UV-Licht zartrote Eigenfluoreszenz. Der schon äußerlich sichtbare Unterschied zwischen jungen, roten und alten, blauen Blüten kommt auch in der Fähigkeit zur Neutralrotspeicherung zum Ausdruck.

In jungen Blüten speichern die Vakuolen den Farbstoff nur mäßig, wobei auch bloß ein geringer Kontraktionsgrad erreicht wird. In der Fluoreszenz erscheint der Zellsaft nun intensiver rot als bei oben beschriebener Eigenfluoreszenz, wird aber von der Uraninfluoreszenz des meist an der Basis der Papillenzelle liegenden Kernes noch durchstrahlt. Der Zellsaft der *Anchusa*-Blüte ist demnach vielleicht dem Typus der „vollen“ Zellsäfte



Höflers (1947) zuzuordnen, die nach Toth (1952) bei Neutralrotfärbung rot fluoreszieren, während die „leeren“ in der Fluoreszenz nicht in Erscheinung treten. Entsprechende Versuche mit Akridinorange wurden nicht durchgeführt. Plasmolysiert man diese Zellen, so zeigt sich der gefärbte Zellsaft noch nicht verfestigt, da sich die Vakuole noch verkleinert und, soweit dies die zentripetalen Wandsporne zulassen, abrundet. Das Plasma ist in diesem Falle unverquollen und umgibt als zarter, aber deutlich fluoreszierender Saum die Vakuole.

Die Zellen alter Blüten speichern dagegen das Neutralrot viel intensiver und die Vakuolenkontraktion erreicht demnach auch eine höheren Grad. In der Fluoreszenz sind die Vakuolen nun völlig dunkel, werden von den Kernen nicht mehr durchstrahlt und zwischen sie und die Zellwand schiebt sich ein mattgrün leuchtender Hof. Plasmolysiert man solche Zellen, so verkleinert sich, wie aus Messungen mit dem Okularmikrometer hervorging, der dunkle Vakuolenkörper nicht mehr, sondern nach dem Verschwinden des mattgrünen Hofes liegt ihm ein feiner leuchtender

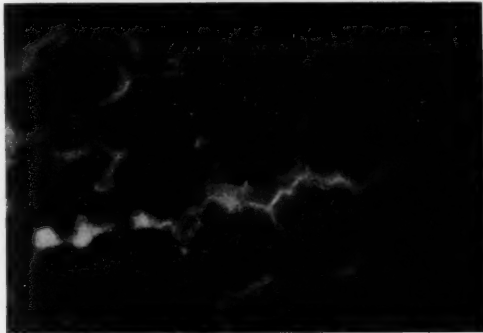


Abb. 1. Oberepidermiszelle einer alten Blüte: Im Fluoreszenzmikroskop zeigt sich das Plasma als deutlich wandständig<sup>1</sup>.

Saum an. In den weiteren Ausführungen möchte ich mich der Nomenklatur Webers (1935) anschließen und den festen Vakuolenkörper als Gel, den ihn umgebenden flüssigen Teil als Sol bezeichnen. Im plasmolysierten Zustand erscheinen auch in den Buchten des Vakuolen-Gels, die sozusagen das Negativ der Zellwandsporne darstellen, hellgrün fluoreszierende Punkte, die sich im Hellfeld als Plasmaansammlung erweisen. Setzt man dem Schnitt nun vorsichtig Leitungswasser zu, so heben sich im Laufe der Deplasmolyse von der dunklen Vakuole Blasen mattgrüner Färbung ab, die sich vergrößern und anfangs noch einen leuchtenden Plasmamensküs tragen, der aber bei weiterer Oberflächenvergrößerung der blasigen Bildungen verschwindet, so daß nach beendeter Deplasmolyse der Ausgangszustand wieder erreicht ist: Ein mattgrüner Hof umgibt das dunkle, die Zellform

<sup>1</sup> An dieser Stelle möchte ich Herrn Ass. Dr. W. Url für die Herstellung der Mikrophotos danken. Die wiedergegebenen Photographien sind Vergrößerungen nach Farbdiaspositiven. Die Originale befinden sich in der Diaspositivsammlung des Pflanzenphysiologischen Institutes der Universität Wien. Aufnahmedaten: Super Anso, Belichtungszeit 8–54 Sek., große Reichertsche Fluoreszenz-Einrichtung Lux UV mit Quecksilber-Höchstdruckbrenner HBO 200.

verkleinert wiedergebende Vakuolen-Gel. Bezüglich der Deutung des mattgrünen Hofes bestanden nun zwei Möglichkeiten, entweder war nur das wandständige Plasma fluorochromiert und umgab ein bei Synärese entstandenes Sol in dünner Schicht oder es lag Plasmoschise vor, bei welcher der Tonoplast der stark verkleinerten Vakuolen anlag.

Eine bessere Klärung dieses Sachverhaltes erbrachten Beobachtungen an ganz großen, alten Blüten, in deren Zellen die Vakuolenkontraktion einen Grad von 0,6–0,7 erreicht hatte und der mattgrüne Hof noch von einer deutlich grellen Kontur umgeben war (Abb. 1). Daß dies keineswegs

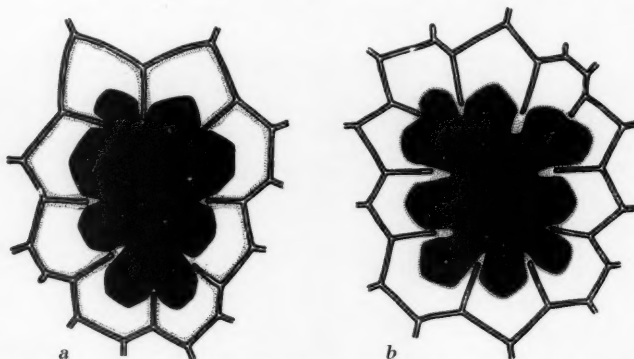


Abb. 2. *a* schematische Darstellung der in Abb. 1 gezeigten Zellen. *b* desgleichen im plasmolysierten Zustand — bei Plasmolyse liegt nach dem Verschwinden des Sols das ursprünglich wandständige Plasma dem Gel an und findet sich besonders in dessen Buchten.

auf Zellwandfärbung zurückging, zeigte die Plasmolyse solcher Zellen, bei welcher sich jener grelle, fluoreszierende Teil von der Membran abhob und auch die Solblasen bei Deplasmolyse deutlicher umrissen waren. Es handelt sich also um fluoreszierendes, minimal gequollenes Plasma, das hier der Zellwand anliegt (Abb. 2 *a* und *b*). Nicht selten konnte bei Deplasmolyse beobachtet werden, daß das Plasma bei Berührung eines Zellwandspornes seine Fluoreszenz verlor, nachdem es beim Platzen der Vakuole abgestorben war.

#### b) Zellen mit gequollenem Plasma

Die bisher behandelten Zellen stellen den häufigsten Fall dar, doch fanden sich daneben sowohl in jungen als auch in alten Blüten andere, die sich meist durch stärkere Fluoreszenz als die übrigen Zellen auszeichneten. Wie aus dem Fluoreszenzbild zu schließen war, handelt es sich hier um Zellen mit verquollenem Plasma. Im Hellfeld bekommt man nämlich beim Heben und Senken des Mikroskoptubus immer wieder scharfe Abbildungen der sich in lebhafter Wimmelbewegung befindenden Mikrosomen. Der Raum zwischen Membran und Vakuole ist also wie beim Kontraktionstyp der *Allium*-Zellen hier mit verquollenem Plasma erfüllt, das nach Döring

(1935) und Höfler-Ziegler-Luhan (1956) das Uranin verstärkt zu speichern vermag (vgl. dazu Abb. 5, S. 575). Waren solche Zellen am Präparatrand gelegen, wo sich ihre papillöse Gestalt in Seitenansicht bot, so zeigte sich die ihnen eigene morphologische Besonderheit, daß die feste Vakuole an der Papillenspitze angeheftet war und frei in das umgebende Plasma hing. Die Einschnitte an der Unterseite des Gels entsprechen in ihrer Lage den basal gelegenen Zellwandvorsprüngen gegen das Zellumen (Abb. 3).

Der Grad der Vakuolenkontraktion bewegte sich in diesen Zellen zwischen 0,5 oder etwas darunter und 0,8 der Zelle. Auch die Plasmafluoreszenz war nicht bei allen gleich intensiv. Während das Plasma jener Zellen, in denen die Vakuolen weniger stark kontrahiert waren, immer grell leuchtete, war dies bei starker Vakuolenkontraktion nicht immer der Fall, vielmehr zeigte sich an den im Hellfeld völlig gleich aussehenden Zellen in der Fluoreszenz deutliche Unterschiede, die, wie sich später in Plasmolyseversuchen ergab, in verschiedener Vitalität begründet waren.

Plasmolysierte man mit 0,8 Mol Traubenzuckerlösung, so hob sich bei den Zellen mit schwacher Vakuolenkontraktion das Plasma von der Wand ab und legte sich, ohne seine Fluoreszenz zu vermindern, als breiter Gürtel um die Vakuole. Da sich diese, wie aus Messungen hervorging, nicht mehr verkleinerte, so handelt es sich hier also um keine echte Plasmolyse, sondern um teilweise Plasmaentquellung. Dieser Vorgang mußte jedoch nicht das gesamte Plasma einer Zelle erfassen, sondern konnte auf die eine oder andere Zellbucht beschränkt sein, wobei auch der nicht entquellende Teil seine Fluoreszenz beibehielt. Bei Zusatz hypotonischer Mittel nahm das Plasma wieder an Volumen zu, wobei es in manchen Fällen seiner Fluoreszenz verlustig wurde, in anderen aber auch diesen Insult gut überstand.

Läßt man auf Zellen mit starker Vakuolenkontraktion, aber schwacher Plasmafluoreszenz Plasmolytikum einwirken, so stellt man fest, daß das Plasma keine oder kaum merkliche Entquellung zeigt und seine Fluoreszenz verliert. Die grell leuchtenden verhielten sich dagegen anders. Entquoll das Plasma sehr schnell, so verschwand auch seine Fluoreszenz sofort. Schritt die Entquellung dagegen nur langsam voran, so starben die Zellen vorerst noch nicht, sondern erst bei „Deplasmolyse“ unter progressiver Fluoreszenzverminderung ab. Andere wieder überdauerten aber auch die abermalige Aufquellung und das Plasma wurde dann erst innerhalb von etwa zwanzig Minuten seiner Fluoreszenz verlustig.

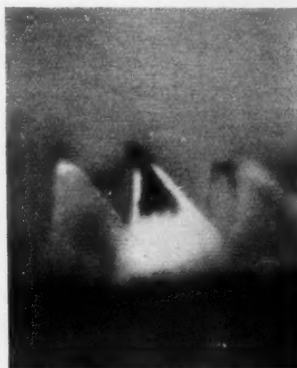


Abb. 5. Oberepidermis-Zelle mit starker Vakuolenkontraktion: Verquollenes Plasma stark fluoreszierend, die feste Vakuole haftet in der Papillenspitze.

Es zeigt sich also, daß stark nekrotische Zellen, die hier sicher vorliegen, in ihrer Speicherfähigkeit für Uranin bereits stark differieren, obwohl sie sich im Hellfeld bezüglich ihres Plasmazustandes nicht unterscheiden. Zur Leistungsfähigkeit der Uraninfärbung als Lebensreaktion siehe Enöckl (1959, 1960, S. 356).

#### c) Zellen mit lokaler Plasmaquellung

Zwischen den zuletzt und den eingangs behandelten Zellen gibt es nun im Erscheinungsbild Übergänge der Art, daß sowohl verquollenes Plasma

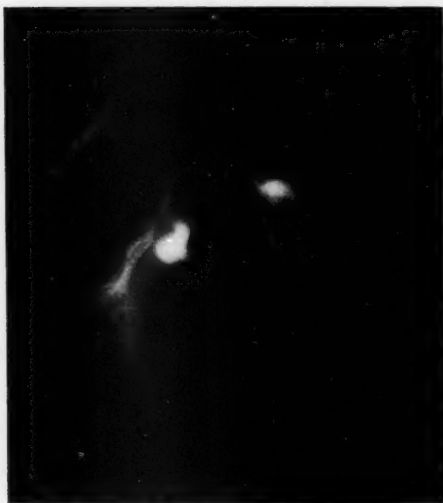


Abb. 4. Oberepidermis-Zelle einer alten Blüte: Lokal gequollenes Plasma zeigt verstärkte Fluoreszenz.

als auch Sol-Gel-Trennung der Vakuole in einer Zelle nebeneinander zu beobachten sind. Dieses Phänomen fand sich ausschließlich in alten Blüten. Die Plasma-verquellung war dabei meist auf jene Stellen beschränkt, wo die Membransporne gegen das Zellumen vorspringen (Abb. 4). Solche Zellen waren normal plasmolysierbar, das Plasma behielt seine Fluoreszenz bei.

Es konnte sich hier aber auch eine Variante zeigen, indem der Solteil, wie dies bereits Weber (1935) beobachtet hatte, ebenfalls Neutralrot speichern konnte, wodurch sich ein besonders farbenprächtiges Bild ergab. Zuerst lag das dunkle verfestigte Gel, das von erdbeerrot leuchtendem

Sol umgeben war. Der Zellwand anliegend fand sich dann das deutlich grün fluoreszierende Plasma. Solche Beobachtungen sprechen wohl am ehesten dafür, daß nicht Plasmolyse, sondern Trennung der Vakuole in Sol und Gel vorliegt. Es konnte aber auch echte Vakuolenkontraktion auftreten, indem ein breiter, grell fluoreszierender Plasmamantel die feste Vakuole umgab und nur einige Zellbucht von Plasma umgebenes, neutralrotgefärbtes Sol zeigten.

#### 4. Beobachtungen an Zellen der unteren Epidermis

Die Zellen der unteren Epidermis unterscheiden sich von denen der oberen dadurch, daß sie nicht papillös sind und daß ihre Vakuolen kein Anthocyan und geringere Speicherfähigkeit für Neutralrot besitzen. Bezüglich letzterer gilt auch hier das für die Oberepidermis Gesagte, daß

nämlich die Zellen junger Blüten weniger Neutralrot aufnehmen als solche alter. In beiden Fällen runden sich die Protoplasten aber bei Plasmolyse noch ab, soweit dies zwischen den auch hier vorhandenen Zellwandspornen noch möglich ist. Der Grad der Vakuolenkontraktion bleibt weit hinter dem der Oberepidermiszellen zurück und ist kaum nennenswert, sofern man von den Wundzellen absieht.

In der unteren Epidermis läßt sich das Wundphänomen, das durch Anstechen der Blüten mit einer Präpariernadel hervorgerufen worden war, besonders schön studieren. Ist das durch die Insultierung gereizte Zellareal

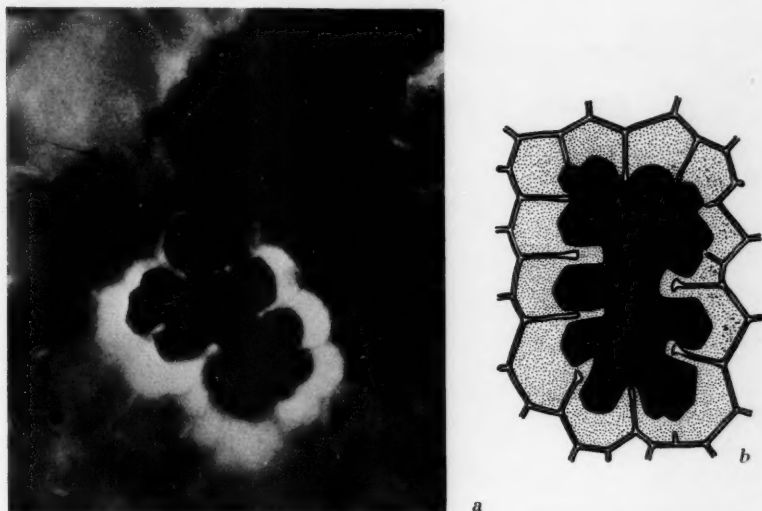


Abb. 5. a Wundzelle aus der unteren Epidermis mit vollständiger Plasmaquellung. b schematische Zeichnung dazu.

groß, so ist der Grad der Vakuolenkontraktion im Zentrum am größten und nimmt nach außen zu ab, wo die Übergangszellen, die jenen Bezirk außen umsäumen, nur noch an der wundzugekehrten Seite Vakuolenkontraktion aufweisen. Kontraktion und Neutralrotspeicherung gehen dabei bezüglich ihrer Stärke parallel. Im folgenden seien Wund- und Übergangszellen für sich gesondert besprochen.

#### a) Wundzellen

Der Kontraktionsgrad dieser Zellen schwankt zwischen 0,9 und 0,5 der Zelle. Diejenigen mit starker Vakuolenkontraktion zeigten im Hellfeld um das tief dunkelrote Gel einen optisch leeren Raum, der in der Fluoreszenz nur in seltenen Fällen noch schwach diffusgrün gefärbt erschien. Plasmolyseversuche verliefen hier fast immer negativ.

Größeres Interesse beanspruchen dagegen die Zellen mit weniger starker Vakuolenkontraktion, bei denen entweder das gesamte Plasma (Abb. 5 a

und b) oder das einiger Zellbuchten gequollen war. Wie in der Oberepidermis findet sich hier bei allseits verquollenem Plasma und gleichem Kontraktionsgrad mitunter verschieden starke Plasmafluoreszenz. Erfolgt bei Zusatz von Plasmolytikum sehr rasche Entquellung, so verschwindet auch hier die Fluoreszenz ebenso rasch, wobei die Zellen absterben. Geht die Entquellung aber langsam vor sich oder kann sich auch die Vakuole noch etwas verkleinern, so erleidet die Plasmafluoreszenz keine Einbuße, sondern vermindert sich dann meist erst bei Deplasmolyse. Auch hier fanden sich Zellen, bei denen nur einige Buchten Entquellung zeigten, während in anderen das nicht entquollene Plasma als leuchtende Kuppe der festen Vakuole aufsaß. Bereits Höfler-Ziegler-Luhan (1956) weisen darauf hin, daß irreversibel verquollenes Plasma dennoch zu erhöhter Uraninspeicherung befähigt bleibt.

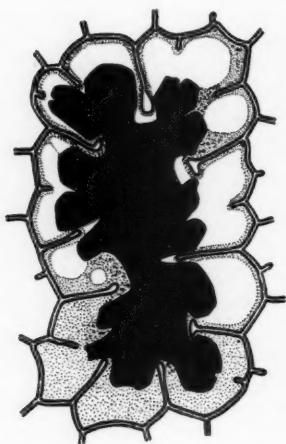


Abb. 6. Zelle im Wundbereich der unteren Epidermis. Sie zeigt gequollenes Plasma und in diesem entstandene, farblose Vakuolen.

In anderen Fällen, in denen das schön fluoreszierende Plasma das Gel allseits umgab, konnte bei Plasmolyse überhaupt keine Reaktion beobachtet werden. Das Plasma entquoll nicht, behielt vorerst seine Fluoreszenz bei, die nach fünf bis zehn Minuten immer schwächer zu werden begann und nach ca. einer halben Stunde völlig verschwunden war. Es handelt sich hier wahrscheinlich um fortschreitende Nekrose, bei der das Plasma die Uraninbindung langsam aufgibt und sich entfärbt.

Zwischen Zellen im Wundbereich, die keine oder völlige Plasmaverquellung aufwiesen, fanden sich mitunter andere, die beides vereint zeigten. So machte sich in einem Fall innerhalb des grell fluoreszierenden Plasmas ein kreisrunder Schatten bemerkbar, der sich bei Hellfelduntersuchung als Plasmavakuole erwies. In einer anderen Zelle kam dieses Ver-

halten noch deutlicher zum Ausdruck, wie das Abb. 6 wiedergibt. Da die Plasmafluoreszenz für eine photographische Aufnahme bereits zu schwach war, wurde im Hellfeld eine Zeichnung angefertigt, die ganz deutlich zeigt, daß manche Zellbuchten nur von verquollenem Plasma erfüllt sind, in anderen wieder der Raum zwischen wandständigem Plasma und der verfestigten Vakuole optisch leer erscheint. Zwischen diesen beiden Grenzfällen gibt es aber Übergänge, indem zwischen benachbarten Zellwandspornen verquollenes Plasma einen optisch leeren Raum umspannte. Gerade solche Beobachtungen lassen aber den Eindruck entstehen, als ob hier große Vakuolen im Plasma vorhanden wären, was für die Ansicht Küsters (1939) sprechen würde, daß das Erscheinungsbild der Vakuolenkontraktion bei den Borraginaceen so zustande käme, daß das Plasma zuerst wohl aufquellen, dann aber stark vakuolisieren würde. Wie Küster (1936, S. 553) berichtet, können bei



anthocyanführenden *Allium*-Zellen im Laufe der pathologischen Zytogenese im Plasma farblose Vakuolen entstehen. In jüngster Zeit beobachtete van der Merve (1959) vergleichbare Vorgänge bei der normalen Entwicklung der Blütenblätter von *Primula kewensis*.

#### b) Übergangszellen

Was nun die Übergangszellen am Wundrand anlangt, so zeigt sich, daß der der Wundstelle zugekehrte Vakuolenteil stärker kontrahiert ist als die analoge Gegenseite (Abb. 7). Dementsprechend ist auch die Neutralrotspeicherung im Wundteil viel intensiver und nicht selten macht sich hier

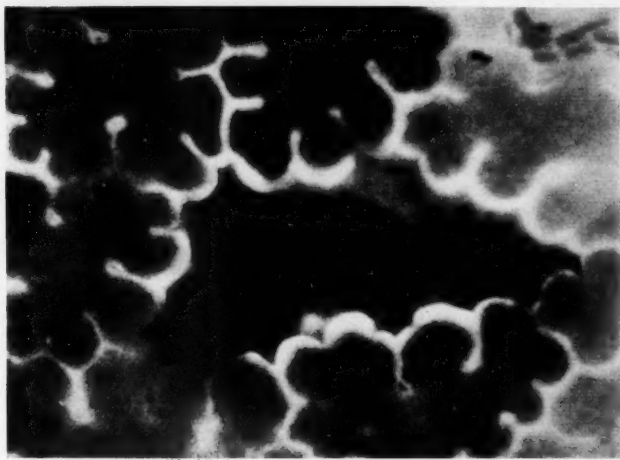


Abb. 7. Wundrandzellen zeigen an der der Wundstelle zugekehrten Seite stärkere Vakuolenkontraktion: Gequollenes Plasma hat stärkere Fluoreszenz, mattere Stellen sind neutralrot-gefärbtes Sol.

auf der die Zellform getreu nachbildenden Vakuole eine körnige Farbstofffällung bemerkbar. Auch in diesen Zellen waren bezüglich des Plasmas die bereits bekannten Fälle möglich, nämlich gänzliche, teilweise oder keine Verquellung, wobei in den letzten beiden Fällen das Sol auch mit Neutralrotspeicherung angetroffen werden konnte. Bei Plasmolyse hob sich der Protoplast im wundabgekehrten Zellteil von der Membran ab und nahm konvexe Form an, während sich das Plasma des Wundpoles in die Buchten der sich nicht mehr verändernden, festen Vakuole zurückzog und hier in Form leuchtender Punkte in Erscheinung trat.

An Schnitten der unteren Epidermis wurden auch Umlagerungsversuche angestellt, bei denen mit Uranin gefärbte Präparate die Nacht über in Leitungswasser belassen wurden. Döring (1935), Höfler-Ziegler-Luhan (1956) hatten nämlich beobachtet, daß in *Allium*-Plasma gespeichertes Uranin nach mehrstündigem Wässern der Schnitte nach der Vakuole hin abgegeben worden war. Enöckl (1960) erzielte denselben

Effekt bei Einwirkung schwach konzentrierter Ammonkarbonatlösungen. Bei *Anchusa*-Epidermen, die nach der Färbung zwölf Stunden gewässert worden waren, hatte sich nun gezeigt, daß nur verquollenes Plasma, sofern es noch lebte, schwache Fluoreszenz aufwies, während die intakten Flächenzellen fluoreszenzfrei waren. Da sich der Farbton der Vakuolen nicht verändert hatte, war der Farbstoff entweder exosmiert oder seine Fluoreszenz gelöscht worden. Die Zellen lebten, da sie normal plasmolysierbar geblieben waren. In einem Versuch, bei dem die Schnitte während einer Stunde zweimal plasmolysiert und zwischendurch deplasmolysiert worden waren, war von einer Plasmafluoreszenz kaum noch etwas zu erkennen; da die Zellen noch normale Plasmolyseform zeigten, so würde dieses Verhalten wohl eher für eine Farbstoffexosmose als für eine Fluoreszenzlöschung sprechen.

### Zusammenfassung

1. Mit Hilfe der Fluorochromierung mit Uranin (Na-Fluoreszein) wurde der Zustand des Plasmas in den Zellen der Blütenepidermen von *Anchusa officinalis* bei Vakuolenkontraktion, die durch Neutralrotspeicherung ausgelöst worden war, untersucht.

2. In der Mehrzahl der Fälle lag das Plasma als leuchtender Saum der Zellwand an. Es handelt sich um Synärese im Sinne Webers (1935), bei der sich der kolloide Zellsaft in einen festen Gel- und einen flüssigen Solteil scheidet (vgl. Abb. 2 a). Diese Zellen sind normal plasmolysierbar, wobei das Sol verschwindet, so daß das Plasma dem Gel anliegt, in dessen Buchten es dann vorzugsweise in der Fluoreszenz in Form von grelleuchtenden Punkten in Erscheinung tritt (vgl. Abb. 2 b). Bei Deplasmolyse abermals entstehende, sich vom Gel abhebende Solbasen drängen das Plasma wieder zur Wand zurück. Der Solteil konnte in gewissen Fällen ebenfalls zur Neutralrotspeicherung befähigt sein, wobei dann in der Aufsicht die mattgrüne Fluoreszenz des an den Periklinalwänden liegenden Plasmas von der Neutralrotfluoreszenz überdeckt wurde.

3. In anderen Fällen kam es zu einer allgemeinen oder nur lokalen Plasmaquellung (vgl. Abb. 4 und 5), die sich bei Einwirkung von Plasmolytikum als teilweise oder ganz reversibel erwies. Ging die Entquellung, oft nur auf einige Zellbuchten beschränkt, rasch vor sich, so erlosch die Fluoreszenz sofort und das Plasma starb ab. Plasmabezirke, die nicht oder nur langsam entquollen, behielten dagegen ihre Fluoreszenz bei, die erst bei fortschreitender Nekrose an Intensität einbüßte.

4. Beobachtung an Zellen mit lokaler Plasmaquellung, die sich besonders im Wundfeld der unteren Epidermis fanden, ließen den Eindruck entstehen, daß sich im Plasma große, neue Vakuolen gebildet hatten, die den bei der synäretischen Zellsaftentmischung entstehenden ähnlich sehen (vgl. Abb. 6).

5. Es scheint also bei den Borraginaceen zwei verschiedene Möglichkeiten einer Vakuolenkontraktion zu geben. Erstens eine synäretische Sol-Gel-Trennung des kolloidalen Zellsaftes, zweitens eine Verkleinerung der galertigen Vakuole, mit der eine allgemeine Plasmaaufquellung Hand in

Hand geht, wobei dann im Plasma nachträglich noch sekundäre Vakuolen entstehen können.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Karl Höfler, sei für die Anregung und stete Förderung dieser Arbeit herzlichst gedankt. Auch Herrn Dozent Dr. Helmut Kinzel gilt mein besonderer Dank, der mir immer beratend zur Seite stand.

#### Literatur

- Döring, H., 1935: Versuche über die Aufnahme fluoreszierender Stoffe in lebende Pflanzenzellen. Ber. dtsh. bot. Ges. 53, 415.
- Enöckl, F., 1959: Vitalitätsprüfung reifer und überreifer Zellen aus dem Fruchtfleisch von *Sorbus aria*. Protoplasma 51, 320.
- 1960: Uranin-Fluorochromierung von *Allium*-Zellen nach Vorbehandlung mit Ammonkarbonat. Protoplasma 52, 344.
- Gicklhorn, J., und L. Möschl, 1930: Vitalfärbung und Vakuolenkontraktion an Zellen mit stabilem Plasmaschaum. Protoplasma 9, 521.
- und F. Weber, 1927: Über Vakuolenkontraktion und Plasmolyseform. Protoplasma 1, 427.
- Henner, J., 1934: Untersuchungen über Spontankontraktion der Vakuolen. Protoplasma 21, 81.
- Höfler, K., 1947: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? Mikroskopie 2, 13.
- A. Ziegler und M. Luhan, 1936: Fluorochromierungsstudien mit Uranin. Protoplasma 46, 322.
- Hofmeister, L., 1940 a: Mikrurgische Studien an Borraginoideen-Zellen. I. Mikrodissektion. Protoplasma 35, 65.
- 1940 b: Mikrurgische Studien an Borraginoideen-Zellen. II. Mikroinjektion und mikrochemische Untersuchung. Protoplasma 35, 161.
- Keil, R., 1930: Über systolische und diastolische Veränderungen der Vakuole in den Zellen höherer Pflanzen. Protoplasma 10, 568.
- Kenda, G., und F. Weber, 1952: Rasche Vakuolen-Kontraktion in *Cerinthe*-Blütenzellen. Protoplasma 41, 458.
- Küster, E., 1927: Beiträge zur Kenntnis der Plasmolyse. Protoplasma 1, 73.
- 1939: Über Vakuolenkontraktion und Anthozyanophoren bei *Pulmonaria*. Cytologia 10, 44.
- 1950: Über Vakuolenkontraktion in gegerbten Zellen. Protoplasma 39, 14.
- 1956: Die Pflanzenzelle. 3. Auflage, Jena.
- Merve, W. J. van der, 1959: Die Ausdifferenzierung des Vakuolensystems in Blüten- und Laubblattepidermen von *Primula kewensis*. Protoplasma 50, 370.
- Schumacher, W., 1936: Untersuchungen über die Wanderung des Fluoresceins in den Haaren von *Cucurbita Pepo*. Jb. wiss. Bot. 82, 507.
- Strugger, S., 1938: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Speicherung und Wanderung des Fluoreszeinkaliums in pflanzlichen Geweben. Flora 132, 253.
- 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Auflage, Berlin.
- Toth, A., 1952: Neutralrotfärbung im Fluoreszenzlicht. Protoplasma 41, 103.
- Weber, F., 1935: Vakuolenkontraktion der Borraginaceen-Blütenzellen als Synärese. Protoplasma 22, 4.
- und G. Kenda, 1953: Zweimalige Vakuolenkontraktion in *Cerinthe*-Zellen. Phytion 4, 315.

# Licht- und elektronenoptische Untersuchungen über den Einfluß von Streptomycin auf *Sinapis alba* L.

Von

**Wolf Rossner**

Aus dem Botanischen Institut der Westfälischen Wilhelmsuniversität Münster/Westf.

Mit 22 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. Februar 1960)

## I. Einleitung

Die Beobachtung von Euler (1947, 1948), daß Karyopsen von *Hordeum vulgare*, die in einer Streptomycinlösung zum Keimen gebracht wurden, chlorophylldefekte Blätter hervorbringen, ist der Anstoß zu einer Reihe von Arbeiten gewesen, die sich mit dem Einfluß und den Wirkungsmechanismen von Streptomycin auf höhere Pflanzen beschäftigten.

Die Hoffnungen, im Streptomycin eine Substanz zu besitzen, mit deren Hilfe sich gerichtete Plastidenmutationen durchführen lassen, haben sich nicht bestätigt, obwohl von Provvasoli und Mitarb. (1948) streptomycin-induzierte Verlustmutanten bei *Euglena* beschrieben wurden und Dube (1952) mit Hilfe dieses Antibiotikums einen chlorophyllarmen Stamm von *Chlorella vulgaris* erhielt.

Die Ursache des Antichlorophylleffektes durch Streptomycin sah Euler (1950) in einer chemischen Blockierung eines Enzymes, das an der Chlorophyllsynthese beteiligt ist. Dieser chemischen Hemmung stellte er ausdrücklich die genetische gegenüber, die als Wirkungsmechanismus echter chlorophylldefekter Mutanten anzusehen ist. Auf Grund weiterer Beobachtungen und physiologischer Untersuchungen bestand jedoch Veranlassung zu der Vermutung, daß die Wirkung von Streptomycin auf höhere Pflanzen komplexer Natur ist. In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß Streptomycin ein gutes Fällungsmittel für Nucleoproteide ist (Euler und Heller 1948). Da es mit diesen eine salzartige Verbindung einzugehen vermag, steigt die fällende Wirkung mit der Zunahme der Molekülgröße der Nucleoproteide (Giuliano und Mitarb. 1954). Es ließen sich auch isolierte Chloroplasten mit Streptomycin fällen (Bracco und Euler 1947), obwohl einmal ergrünte Blätter mit Hilfe des Antibiotikums nicht

mehr gebleicht werden konnten (Euler und Heller 1950, Euler 1955). Trotz seines hohen Molekulargewichtes wird Streptomycin durch die Wurzeln aufgenommen. Offensichtlich erfolgt die Aufnahme sogar unter Energieaufwand, da die Streptomycinwirkung sich durch Stoffwechselgifte (Pramer 1956) und Mangel an Energiereserven, hervorgerufen durch Verdunkeln der Pflanze, hemmen läßt (Deken-Grenson 1955). Dye (1956) ermittelte an jungen Pfirsichpflanzen nach 72 Stunden in den unteren Blättern einen doppelt so hohen Streptomycingehalt als in der Ausgangslösung, in der die Pflanzen standen. Neben der schnellen Aufnahme wurde hier gleichzeitig demonstriert, daß eine Speicherung des Antibiotikums in der Pflanze möglich ist. Auch Pramer (1956) beobachtete neben der Abhängigkeit vom pH-Wert und der Temperatur in bezug auf die Aufnahmegeschwindigkeit einen Kumulationseffekt bei *Nitella clavata*, der an eine begrenzte Kapazität gebunden sein soll. Da die Bestimmung des Streptomycingehaltes in der Pflanze auf mikrobiologischem Wege erfolgte, geht ferner daraus hervor, daß es seine antibiotische Aktivität nicht verloren hat (Winter und Willeke 1951).

Über Wachstumshemmungen unter dem Einfluß von Streptomycin ist wenig berichtet worden. Vávra (1956) erwähnte, daß Wachstumshemmungen bei *Euglena* nur sekundär durch mangelnde Photosynthese in Erscheinung traten. Gray (1955) beobachtete eine mit der Streptomycinkonzentration zunehmende Hemmung des Wurzelwachstums von Tomatenkeimlingen.

Auch cytologische Untersuchungen an höheren Pflanzen, die mit Streptomycin behandelt wurden, fehlen fast vollständig. Über die Struktur der Plastiden aus streptomycinbehandelten Pflanzen wurden nur wenige und sich widersprechende Angaben gemacht. So vertraten Euler und Heller (1950) den Standpunkt, daß bei *Hordeum vulgare* eine Hemmung der Plastidenentwicklung auf einem chondriosomen-ähnlichen Stadium erfolgt. Deken-Grenson (1955) verlegte diese Hemmung auf das unigranuläre Proplastidenstadium und postulierte eine morphologisch ungeschädigte und physiologisch intakte embryonale Zelle, da nach Fortfall des Streptomycineinflusses die Pflanzen ihr Wachstum wieder aufnahmen. Signol (1954) beschrieb ebenfalls an der Gerste vakuolisierte und degenerierte Plastiden bei gleichzeitigem Zerfall der Chondriosomen.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit sollte es sein, durch cytologische Untersuchungen weitere Einblicke in den Wirkungsmechanismus des Streptomycins zu bekommen.

## II. Material und Methode

Die für die cytologischen Untersuchungen verwendeten Samen von *Sinapis alba* stammten aus dänischem Exportsaatgut. Die sich über etwa zwei Jahre hinziehenden Versuche wurden mit dem Material einer Ernte durchgeführt. Das in der Folge als Streptomycin (STM) bezeichnete Präparat war stets kristallines Dihydrostreptomycinsulfat der Firma Bayer-Leverkusen. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf dieses Produkt und sind nicht auf die freie Base umgerechnet. Zur Anwendung gelangten stets frisch angesetzte und nicht sterilisierte

Lösungen in Leitungswasser, deren pH-Wert 7,1–7,3 in allen Konzentrationsstufen betrug.

Die Kultivierung der Senfpflanzen erfolgte unter folgenden Bedingungen: Zur Keimung wurden die Samen in Petrischalen auf Filtrierpapier je 25 in 8 ccm Flüssigkeit (STM-Lösung oder Leitungswasser) ungequollen eingebracht. Nach 12- bis 15stündiger Dunkelperiode standen sie bei 20–22° C und 3000 Lux weißem Dauerlicht, bis sich die Cotyledonen zu entfalten begannen, was je nach Jahreszeit drei bis fünf Tage dauerte. Die Einwirkungszeiten des STM paßten sich den Keimungszeiten an, da nur aktive Meristeme von dem Antibiotikum beeinflusst wurden

und das Eindringen in alle Zellen gewährleistet werden sollte. War eine längere Kultivierung beabsichtigt, so wurden die jungen Pflanzen anschließend gut mit Wasser abgespült und in Gartenerde bei nicht geänderten Licht- und Temperaturbedingungen umgepflanzt.

Bis zu diesem Zeitpunkt waren im Wachstum der Pflanzen noch keine deutlichen Unterschiede zu erkennen. Die STM-Chlorosen traten jedoch deutlich in Erscheinung. Während die Cotyledonen der Kontrollen ergrünten, blieben STM-behandelte Pflanzen zunächst gelblich und wurden dann weiß. Auf der Blattunterseite und am Hypocotyl war eine auffallende Anthocyanbildung zu erkennen.

Um Keimlinge irreversibel zu schädigen, wurde eine STM-Konzentration von 1:1000 in Leitungswasser gewählt. Bei dieser Konzentration zeigten alle Pflanzen die Chlorose, bildeten vom 12. bis 14. Tage nekrotische Stellen an den Blattanlagen und waren spätestens nach 21 Tagen eingegangen. Die Entwicklung der Pflanzen ging nie über eine Streckung des Hypocotyls und eine höchstens bis 1 mm ausgewachsene Plumula im Sproßmeristem und eine

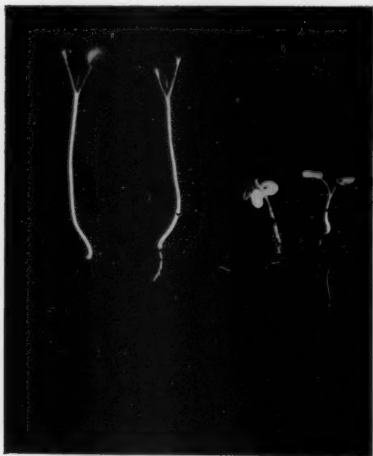


Abb. 1. 14 Tage alte *Sinapis-alba*-Keimlinge. Links die Kontrollen, rechts zwei Pflanzen, die 3 Tage mit STM 1:1000 vorbehandelt wurden. Die chlorotischen Cotyledonen, die nicht angewachsene Plumula, die schwache Streckung des Hypocotyls und das geringe Wurzelwachstum sind gut zu erkennen. Zwei Drittel der nat. Größe.

bis zu 25 mm lange Primärwurzel ohne Anlage von Seitenwurzeln hinaus (Abb. 1).

Bei STM-Konzentrationen von 1:1000 bis 1:100 000 traten in zunehmendem Maße reversible Chlorosen der Cotyledonen mit nachfolgendem Auswachsen der Plumula und normalem Ergrünen der Folgeblätter auf. Um ergrünungsfähiges Material zu erhalten, wurde eine STM-Konzentration von 1:50 000 gewählt, bei der etwa je ein Drittel der Pflanzen irreversibel, reversibel oder nicht geschädigt waren. Für die Fixation wurden Pflanzen mit schwach ausgewachsener Plumula ausgesucht, deren Cotyledonen zu ergrünen begannen. Für die cytologischen Untersuchungen wurden sowohl gleichaltrige Kontrollen als auch solche, deren Entwicklungszustand den STM-geschädigten entsprach, herangezogen.

Die Vitalität bzw. Prä mortalität der untersuchten Zellen wurde durch



Plasmolyse mit 0,6 mol  $\text{KNO}_3$  und 0,8 mol Glucose nachgewiesen. Genauere Ergebnisse lieferte die Vitalfluorochromierung mit Acridinorange nach Strugger (1940).

Als optische Ausrüstung für die lichtmikroskopischen Untersuchungen stand ein Ortholux der Firma Leitz mit den Trockenobjektiven 25:1 n. A. = 0,50 und 45:1 n. A. = 0,65 sowie die Ölimmersionsobjektive 100:1 n. A. = 1,50 und 1/16 Fl. 114:1 n. A. = 1,32 zur Verfügung. Für die photographischen Aufnahmen wurde eine Leica 1c mit einem Mikroaufsatz der Firma Zeiss-Winkel und als Filmmaterial Agapanfilm der Firma Agfa-Leverkusen verwendet.

Für die fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen diente eine Philips Quecksilber-Hochdrucklampe CS 150 als Erregerlichtquelle. Als Filter bewährten sich UV-Filter 2 + 4 mm (UG 1) in Verbindung mit dem Okularsperrfilter OG 1 2,5 mm und einem Flüssigkeitsfilter aus 3%iger  $\text{CuSO}_4$ -Lösung.

Für die elektronenoptischen Untersuchungen erfolgte die Anzucht der Pflanzen und die Entnahme des Materials in der gleichen Weise, wie oben beschrieben. Das Freipräparieren des Vegetationskegels erfolgte unter einer zehnfach vergrößernden binokularen Lupe, soweit es ohne mechanische Beschädigung des Meristems und ohne traumatische Einflüsse durch den Wundreiz möglich war, was durch das Vorhandensein von Pflanzenschleim an den jüngsten Folgeblättern sehr erschwert wurde. Die Fixation erfolgte zwei Stunden lang in veronalacetatgepuffertem 1%igem Osmiumtetroxyd, das auf pH 7,2 eingestellt war, bei +4° C. Dabei wurde so verfahren, daß zunächst mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe das Fixationsmittel infiltriert wurde, um ein schnelleres Eindringen des Agens zu erreichen; dann wurde das  $\text{OsO}_4$  gewechselt.

An die Wässerung in Aqua dest. schloß sich eine Kontrastierung in 1%igem wäßrigen Uranylacetat (Strugger 1956a) an. Dann wurde in üblicher Weise über Äthylalkohol entwässert, in einem Gemisch von Methyl- und Butylmetacrylat 2:8 eingebettet und 24 Stunden bei 47° C polymerisiert.

Die Anfertigung der Ultradünnschnitte erfolgte mit dem Ultramikrotom von Sjöstrand (Stahlmesser) sowie mit dem Ultramikrotom von Leitz (Diamant- und Glasmesser). Die elektronenoptischen Aufnahmen wurden mit einem Elmiskop Ia der Firma Siemens durchgeführt<sup>1</sup>. Die Strahlspannung betrug immer 60 kV.

### III. Die Plastidenentwicklung

#### 1. Die unbeeinflusste ontogenetische Plastidenentwicklung

Die von Schimper (1883) und Meyer (1883) geforderte Kontinuität der Chloroplasten kann nach dem heutigen Stand der Forschung nicht mehr in Zweifel gezogen werden. Auch das lichtmikroskopisch von Strugger (1950, 1953, 1954a, b) beobachtete Proplastid mit einem Primärgranum in einem amöboiden Stroma als jüngste und ontogenetisch einfachste Form der Chloroplasten wird licht- und elektronenoptisch von vielen Autoren bestätigt (Böing 1955, Fasse-Franzisket 1955, Grave 1955, Kaja 1956, Leyon 1954, Mühlethaler 1956, Heitz 1956, Strugger 1957b). Die ontogenetische Entwicklung der somatischen Plastiden ist jedoch bei dikotylen Pflanzen bis jetzt nur wenig untersucht worden

<sup>1</sup> Für die Durchführung der elektronenoptischen Aufnahmen danke ich Fr. R. Horig, Elektronenmikroskopische Abteilung der Universität Münster, Leitung Dozent Dr. L. Reimer.

(Strugger und Perner 1956), und der Feinbau der Chloroplasten in elektronenoptischen Dimensionen ist noch nicht restlos geklärt. Es erwies sich deshalb als notwendig, Kenntnis von der normalen ontogenetischen Plastidenentwicklung zu erlangen, um die Formen der Hemmungen und Schädigungen durch den Einfluß von STM beurteilen zu können. Das zur cytologischen Untersuchung gelangende Material wurde zu allen Jahreszeiten kultiviert und war zum Zeitpunkt der Fixation 5 Tage bis 6 Wochen alt. Unterschiede in der Plastidenentwicklung, die durch die Jahreszeit oder das Alter der Pflanzen bedingt waren, konnten nicht festgestellt werden. Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen bewährten sich als Fixationsmittel Gemische nach Flemming-Heitz und

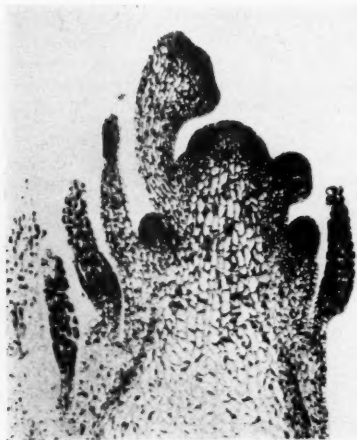


Abb. 2.

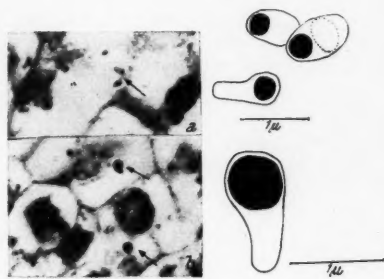


Abb. 3.

Abb. 2. Längsschnitt durch die Sproßachse einer 10 Tage alten unbehandelten Pflanze. Die Meristemebereiche im Sproß und in den Wurzelanlagen treten durch den Reichtum an Protoplasma und die dadurch bedingte intensive Färbung hervor. Flemming-Heitz/Hämatoxylin n. H.; Vergr. 100fach.

Abb. 3. Unigranuläre, amöboide Proplastiden aus dem Sproßmeristem (Abb. 3a) und den Blattanlagen (Abb. 3b) einer 5 Tage alten unbehandelten Pflanze. Die gestrichelte Linie in der Handzeichnung deutet ein Stärkekorn an. Altmann/Säurefuchsin n. A.; Vergr. 1400fach.

Altmann-Romeis (1948) in gleicher Weise gut. Die Fixationszeiten betrugen sieben bis zehn Stunden. Nach der Wässerung wurde dann über Äthylalkohol und Methylbenzoat in Paraffin eingebettet. Wegen der geringen Größe der Meristemzellen wurde die Schnittstärke auf  $4\mu$  eingestellt.

Zur Darstellung der Plastiden, insbesondere ihrer Grana, wurde mit Säurefuchsin nach Altmann gefärbt und mit Lichtgrün gegengefärbt sowie die Färbung mit Eisenhämatoxylin nach Heidenhain verwendet. Im ersten Fall zeigten die Grana eine kräftig rote und das Stroma ein diffuses grünes Färbung, bei der zweiten genannten Färbemethode waren die Grana dunkelblau bis schwarz und das Stroma diffus blau gefärbt.

a) Ergebnisse

Der mediane Längsschnitt durch die Sproßachse junger und älterer Pflanzen zeigte in gleicher Weise, daß die ur- und postmeristematische Zone nur sehr klein ist (Abb. 2). Die Zellen hatten eine kubische Gestalt mit einer Kantenlänge von  $6\mu$  bis  $8\mu$  und waren fast vollständig vom Zellkern ausgefüllt. In den jungen Blattanlagen, die eine Länge von 400 bis  $500\mu$  erreicht hatten, waren nur noch kleine urmeristematische Bezirke zu finden.

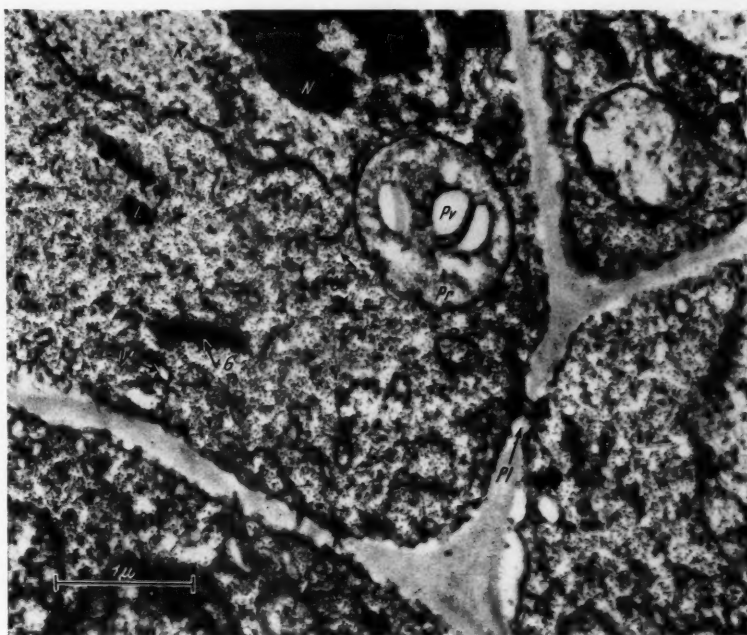


Abb. 4. Ultradünnschnitt aus dem Urmeristem des Sprosses einer unbehandelten Pflanze. Es bedeuten: Pl = Plasmodesmen, G = Golgi-Apparat, Pp = Proplastid mit drei scharf begrenzten Vakuolen (Pv), K = Zellkern mit doppelt konturierter Kernmembran und Nucleolus (N), L = Lipidtropfen und Cy = Cytoplasma, das an der bezeichneten Stelle besonders deutliche Cytonemata erkennen läßt. V = Eine der wenigen, sublichtmikroskopisch kleinen Vakuolen.  $\text{OsO}_4$ /Uranylacetat; Pr.-Vergr. 8000fach.

Die jüngsten Plastidenformen waren auch bei *Sinapis alba* Proplastiden mit einem lichtmikroskopisch scheibchenförmigen Primärgranum in einem amöboiden Stromaplasma (Abb. 3). Ihre Gestalt war meist keulenförmig; in ihrer längeren Achse erreichten sie selten höhere Werte als  $1,0\mu$ , während die Breite zwischen  $0,4\mu$  und  $0,8\mu$  schwankte. Da Stärke auch bei den postmeristematischen unigranulären Proplastiden unter den angegebenen Kulturbedingungen relativ selten gefunden wurde, bestimmte das etwa  $0,4\mu$

im Durchmesser betragende, stark färbbare Primärgranum häufig die breiteste Stelle des Plastids. In den meristematischen Zellen der Blattanlagen waren grundsätzlich gleiche Formen und Größen der amöboiden Proplastiden zu finden, doch schienen hier die Primärgrana im allgemeinen etwas größer zu sein.

In Ultradünnschnitten können Urmeristemzellen an der Größe der Zellen, an der Relation Zellkern zu Zellvolumen und besonders an der dichten Lagerung des Cytoplasmas und dem Vorhandensein nur weniger, sublichtmikroskopischer Vakuolen erkannt werden (Abb. 4).



Abb. 5.



Abb. 6.

Abb. 5. Zwei Proplastiden einer unbehandelten Pflanze. Oben Primärgranum in Flächenansicht, unten im Profil (mit Pfeil markiert).  $\text{OsO}_4$ /Uranylacetat; Pr.-Vergr. 8000fach.

Abb. 6. Primärgranum in Aufsicht. „Elementareinheiten“ homogen osmiophil und in Reihen geordnet.  $\text{OsO}_4$ /Uranylacetat; Pr.-Vergr. 15.000fach.

Die in diesem Bereich angeschnittenen Plastiden entsprachen in Form und Größe den im Lichtmikroskop beobachteten. Die sublichtmikroskopische Feinstruktur zeigte eine doppelt lamellierte Plastidenmembran, die das Stromaplasma umschließt. Das Stromaplasma war schwächer kontrastiert als das Cytoplasma, lockerer gebaut und häufig fanden sich undeutlich begrenzte „leere“ Räume. Im Stromaplasma eingeschlossen, lag ein nicht immer angeschnittener stark osmiophiler und uranophiler Körper, dessen Dimensionen den lichtmikroskopischen Angaben über den Durchmesser eines Primärgranums entsprachen. Im Profil wurden Lamellenlagen aus einer wechselnden Anzahl von Schichten gefunden, während in der Aufsicht globuläre, regelmäßig in Reihen geordnete „Elementareinheiten“ (Perner 1957) zu

erkennen waren. Sie hatten einen Durchmesser von 80 bis 100 Å und waren homogen osmiophil (Abb. 5 und 6).

Die Entwicklung vom amöboiden, unigranulären Proplastid zum ausdifferenzierten Chloroplasten erfolgte, bedingt durch den kleinen Meristembereich, in einem räumlich engbegrenzten Bezirk. Aus demselben Grunde wurden Jungplastiden mit 2–5 Grana lichtmikroskopisch nur selten gefunden. Die Entwicklung wurde durch einen Verlust der Amöboidie einge-

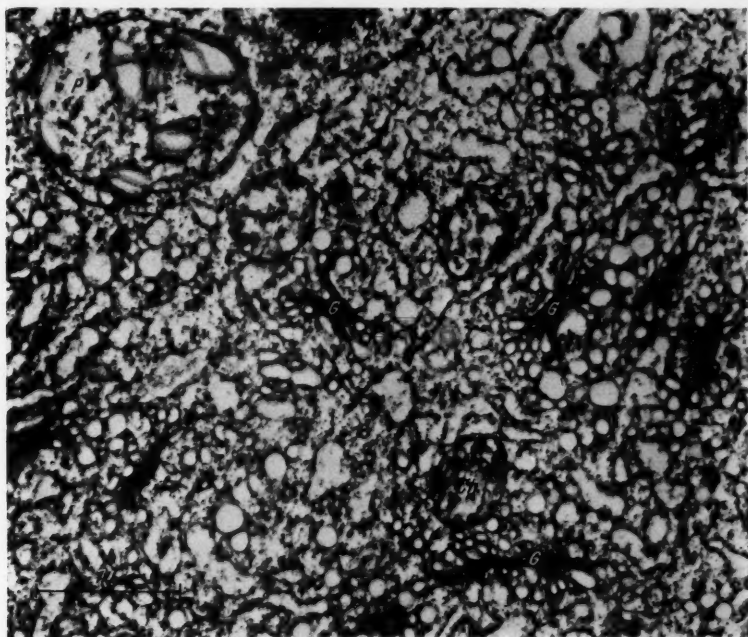


Abb. 7. Aspekt des Protoplasten aus einer Postmeristemzelle. Das Cytoplasma ist aufgelockert und von vielen kleinen Vakuolen durchsetzt. Es bedeuten: Ch = Chondriosomen und P = Plastid im Stadium beginnender Sekundärgranabildung; sonst wie in Abb. 4. OsO<sub>4</sub>/Uranylacetat; Pr.-Vergr. 8000fach.

leitet. Plastiden mit zwei Grana zeigten bereits deutlich eine ellipsoide Form, die auch bei Fehlen von Stärke in Erscheinung trat. Für die Jungplastiden wurden Größen von 1,5 bis 2,5  $\mu$  gemessen. Auch hier konnten keine Unterschiede zu den Plastiden in den Blattmeristemen festgestellt werden.

Die Postmeristemzellen waren größer als die Urmeristemzellen und erreichten eine Länge bis zu 20  $\mu$ . Elektronenoptisch waren sie an ihrem aufgelockerten Cytoplasma und an den zahlreichen kleinen oder bereits zusammenfließenden größeren Vakuolen zu erkennen. Häufig waren gerade in diesem Stadium der Entwicklung zahlreiche Golgi-Körper mit reichlich abgeschnürten Bläschen in den Zellen zu erkennen (Abb. 7).

Die Plastidenentwicklung begann mit einer Längsaufspaltung der Lamellen des Primärgranums zu einem Lamellenpaket, aus dem seitwärts neue Lamellen herauswuchsen, bis sie das ganze Plastid erfüllten (Abb. 8 und 9). Die Breite der Doppellamellen lag in allen Entwicklungsstadien der Plastiden zwischen 80 und 120 Å.

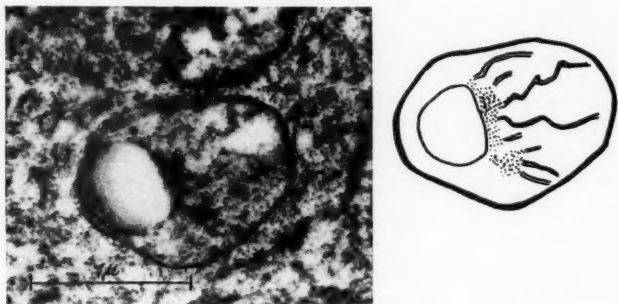


Abb. 8. Proplastid beim Beginn der Trägerlamellenbildung. Von dem nur teilweise angeschnittenen Primärgranum gehen mehrere noch stark flexible Doppellamellen aus.  $\text{OsO}_4$ /Uranylacetat; Pr.-Vergr. 8000fach.

Als nächstes Entwicklungsstadium erfolgte dann die Bildung von Sekundärgranalamellen in Verbindung mit den Trägerlamellen an gleichen Orten

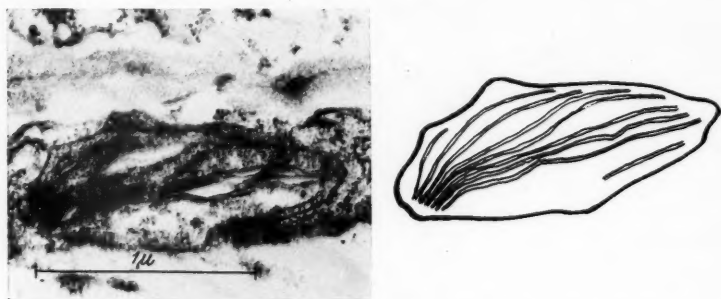


Abb. 9. Proplastid mit Primärgranum im Profil und Trägerlamellen.  $\text{OsO}_4$ /Uranylacetat; Pr.-Vergr. 15.000fach.

übereinander zu annähernd gleicher Zeit. Auf diese Weise entstand die zuerst von Strugger (1950, 1951) lichtmikroskopisch beobachtete geldrollenartige Anordnung der Grana. Durch Vakuolen und Stärkeeinschlüsse traten häufig sekundär Lageveränderungen der Granapakete auf, so daß ihre senkrechte Lagerung zueinander nicht mehr genau zu verfolgen war.



### b) Besprechung der Ergebnisse

Die überwiegend elektronenoptisch an Ultradünnschnitten durchgeführten Untersuchungen zur unbeeinflussten ontogenetischen Plastidenentwicklung bei *Sinapis alba* führten zu dem Ergebnis, daß keine prinzipiellen Unterschiede gegenüber der Plastidenentwicklung anderer Angiospermen vorliegen. Das von Mühlethaler (1956) aufgestellte Schema hat seine Gültigkeit auch für das hier untersuchte Objekt. Unterschiede ergaben sich jedoch für den sublichtmikroskopischen Feinbau des Primärgranums.

Die zuerst an Monocotylen beobachtete kristallgitterähnliche Struktur des Primärgranums (Leyon 1954), die später auch für die Dicotylen nachgewiesen werden konnte (Heitz 1956), bestätigte sich auch für *Sinapis alba*. Im Gegensatz zu den Beobachtungen an *Chlorophytum* (Perner 1956) sind hier die Elementareinheiten kleiner (unter 100 Å), dichter gelagert sowie homogen osmiophil und uranophil. Außerdem konnte keine gitterartige Verbindung untereinander, sondern nur Lagerung in parallel angeordneten Reihen festgestellt werden.

Diese Feinstruktur erinnert damit mehr an die Beschreibung von Sitte (1958) für das Primärgranum von *Pisum sativum*, wo die Elementareinheiten ebenfalls sehr klein (58 Å) und homogen osmiophil sind, doch völlig ungeordnet liegen sollen.



Abb. 10. Längsschnitt durch die Sproßachse einer 14 Tage alten irreversibel durch STM geschädigten Pflanze. Die Sproßspitze hat sich kegelförmig gestreckt; die Blattanlagen beginnen von der Spitze her zu degenerieren. Flemming-Heitz/Hämatoxylin n. H.; Vergr. 100fach.

## 2. Die Plastidenentwicklung in irreversibel durch STM geschädigten Pflanzen

Wurden Samen von *Sinapis alba* 3 Tage lang in einer STM-Lösung 1:1000 in Leitungswasser zur Keimung gebracht, gut abgespült und in Gartenerde weiterkultiviert, so zeigten sich in den Pflanzen bereits 5 Tage später, kurz nachdem sich die Cotyledonen entfaltet hatten, deutliche Veränderungen im Meristemebereich.

Der mediane Längsschnitt durch die Sproßachse 5 Tage alter irreversibel durch STM geschädigter Senfpflanzen ließ lichtmikroskopisch bis in die Scheitelzone keine Zellgruppen erkennen, die als Urmeristemzellen bezeichnet werden konnten. Die Zellgruppen, die ihrer Lage nach mit den Urmeristemen vergleichbar waren, erreichten meist eine Größe von 10 bis

15  $\mu$ . Sie waren stets von mehreren Vakuolen erfüllt, und das Cytoplasma war wie in den übrigen, älteren Zellen körnig und häufig verklumpt, was die Beobachtung sehr erschwerte. Die Begrenzung des gesamten Meristem-bereiches zur Streckungszone war undeutlich, doch größenordnungsmäßig mit dem der Kontrollpflanzen übereinstimmend (Abb. 10). Wurde die mit STM vorbehandelte Pflanze in Gartenerde weiterkultiviert, so konnten vom 14. Tage an nekrotische Stellen an den Cotyledonen und Blattanlagen beobachtet werden, und die Pflanze ging nach weiteren vier bis sechs Tagen ein.

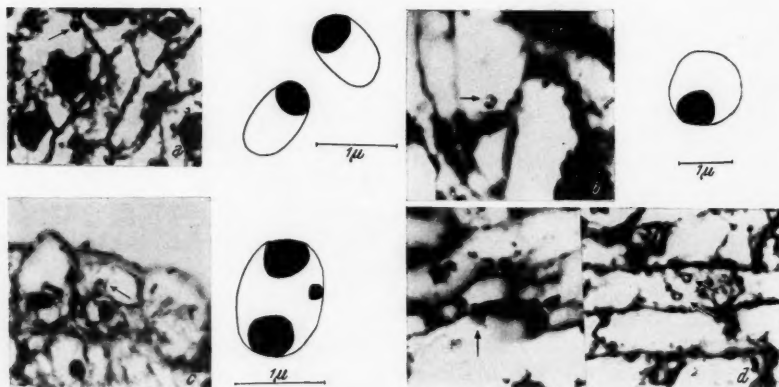


Abb. 11. Lichtmikroskopische Aufnahmen von Plastiden aus Pflanzen, die irreversibel durch STM geschädigt wurden. Abb. 11 a: Unigranuläre Form aus dem Sproß einer 11 Tage alten Pflanze. Altmann/Säurefuchsin n. A.; Vergr. 1400fach. — Abb. 11 b: Unigranuläre Form aus der Blattanlage einer 11 Tage alten Pflanze. Altmann/Hämatoxylin n. H.; Vergr. 1600fach. — Abb. 11 c: Plastid mit drei unterschiedlich großen Grana einer 10 Tage alten Pflanze. Altmann/Hämatoxylin n. H.; Vergr. 1200fach. — Abb. 11 d: Plastiden ohne Granum aus einer 8 Tage alten Pflanze. Altmann/Hämatoxylin n. H.; Vergr. 1300fach.

Die Plastiden wurden vornehmlich in diesem Endstadium der Entwicklung von irreversibel geschädigten Pflanzen wenige Tage vor dem Absterben der ersten Zellkomplexe untersucht, da es so möglich war, alle vorkommenden Plastidenformen in einer Pflanze zu beobachten.

Wie die lichtmikroskopischen Beobachtungen zeigten, waren die jüngsten Formen der Plastiden auch hier Proplastiden, die deutlich ein Primärgranum besaßen (Abb. 11 b). Ihre Länge betrug in den urmeristem-analogen Zonen wie bei den Kontrollen durchschnittlich  $0,9 \mu^2$ ; im Postmeristem wurden häufig auch solche von 1,0 bis  $1,5 \mu$  gefunden. Die Form war stets oval bis rund, so daß nie Breiten unter  $0,7 \mu$  gemessen werden konnten. Ihre Anzahl pro Zelle schien nicht geringer als bei den Kontrollpflanzen zu sein;

<sup>2</sup> Alle Zahlenangaben über Plastiden- und Granagrößen in lichtmikroskopischen Untersuchungen sind das Ergebnis von mindestens 100 Einzelmessungen.

auch wurden übereinstimmende Größen der Primärgrana ermittelt, die fast immer eine terminale Lage einnahmen. Das Stromaplasma war in den meisten Fällen nur gering ausgebildet, die größere Fläche wurde von einem optisch leeren Raum eingenommen, der weder mit Lugolscher Lösung noch mit Gentianaviolett nach Tannin- und Brechweinstein-Vorbehandlung (Němec 1906) eine Stärkereaktion zeigte.

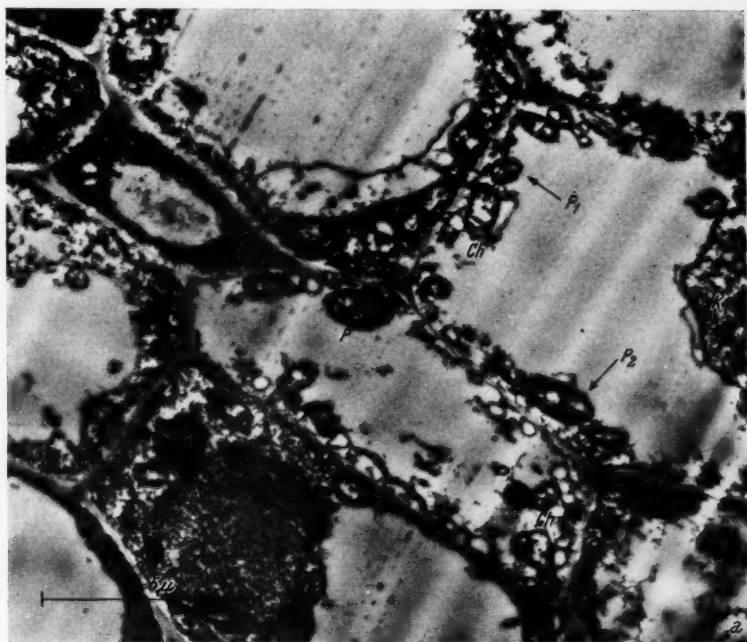


Abb. 12 a: Gewebe aus dem Übergangsgebiet zur Streckungszone eines irreversibel durch STM geschädigten Sprosses. Mit  $P_1$  wurde ein unigranuläres Plastid mit Primärgranum in Aufsicht und mit  $P_2$  ein in der gleichen Zelle liegendes, größeres Plastid mit Trägerlamellen markiert. Die übrigen Bezeichnungen wie in Abb. 4 und 7.  $\text{OsO}_4$ /Uranylacetat; Pr.-Vergr. 2800fach.

Die Variabilität älterer Plastidenformen war sehr groß, wobei auch Unterschiede innerhalb einer Zelle beobachtet wurden (Abb. 12). Sowohl im Postmeristem als auch in der Streckungszone wurden unigranuläre Formen und solche mit mehreren Grana gefunden (Abb. 11 c).

Ihre Grana lagen auch hier peripher an der Plastidenmembran und hatten häufig eine unterschiedliche Größe. Besonders in der Streckungszone wurden daneben blasige, runde Plastiden gesehen, die mit Eisenhämatoxylin nach Heidenhain eine auffallend kräftige Färbung der Peripherie zeigten, etwa 2 bis 3  $\mu$  im Durchmesser besaßen und weder mit Hämatoxylin

noch mit der Säurefuchsin-Färbung nach Altmann ein Granum erkennen ließen (Abb. 11d).

Elektronenoptische Aufnahmen bestätigten das Vorhandensein unigranulärer Plastiden in STM-geschädigten Pflanzen. Das Primärgranum unter-

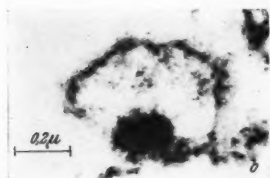


Abb. 12 b: Das unigranuläre Plastid  $P_1$  aus der Abb. 12 a in stärkerer Vergrößerung. Die globulären „Elementar-einheiten“ unterscheiden sich nicht von denen in ungeschädigten Pflanzen. Pr.-Vergr. 15.000fach.

schied sich weder in der Größe noch in der Feinstruktur von den in den Kontrollen aufgefundenen (Abb. 12). Ferner wurden Plastiden beobachtet, in denen neben dem Primärgranum vollständig oder unvollständig ausgebildete Trägerlamellen meist der Plastidenmembran genähert lagen. Auch diese Plastiden dürften lichtmikroskopisch als unigranulär angesprochen werden (Abb. 13). Das Stroma-plasma war meist nur sehr gering ausgebildet. Es lag in dünner Schicht der Plastidenmembran innen an oder umgab das Granum oder die Trägerlamellen, soweit sie noch zur Ausbildung gekommen waren.

Die weitaus größere Zahl jedoch, der in irreversibel durch STM geschädigten

schädigten Pflanzen angeschnittenen Plastiden, besaß keine Struktur, die mit einem Primär- oder Sekundärgranum identifiziert werden konnte. Wenn auch die Möglichkeit im einzelnen Fall nicht ausgeschlossen werden kann, daß zufällig ein solches Granum nicht angeschnitten wurde, so besteht doch durch Untersuchung von Serienschnitten und an Hand von Vergleichen mit den Befunden an Kontrollpflanzen sowie mit den lichtmikroskopischen Untersuchungen kein Zweifel an der Existenz granaloser Plastiden (Abb. 14). Ihre Entstehung ist mit einer Hemmung und Schädigung beim Übergang vom Pro- zum Jungplastid zu erklären. Dabei kommt es zum Auswachsen von Trägerlamellen, deren Zahl und Ausprägung sehr variabel sein können, das Primärgranum wird abgebaut, doch Sekundärgrana bilden sich nicht. Da die Trägerlamellen sublichtmikroskopisch dimensioniert sind, erscheint ein solches Plastid im Lichtmikroskop granalos. Wie sich mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes nachweisen ließ, zeigten

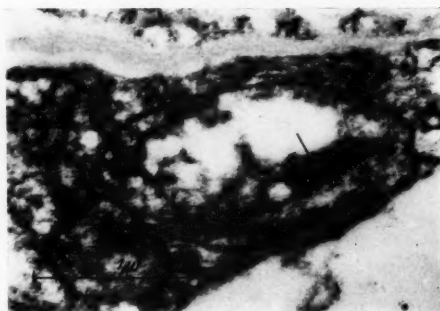


Abb. 13. Ein irreversibel geschädigtes Plastid. Das Primärgranum ist im Profil getroffen. Sein Durchmesser beträgt  $450 \mu$ , die Höhe  $120 \mu$ . Acht osmiophile Lamellenschichten von 80 bis  $120 \text{ \AA}$  Dicke sind neben schwach ausgebildeten Bruchstücken von Trägerlamellen zu erkennen.  $\text{OsO}_4/\text{Uranylacetat}$ ; Pr.-Vergr. 15.000fach.

Wie sich mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes nachweisen ließ, zeigten

auch die granalosen STM-geschädigten Plastiden, wie die mit Grana versehenen, eine deutliche primäre Rotfluoreszenz, die jedoch, da sie nicht auf bestimmte Orte lokalisiert ist, diffus erschien.

Nach der elektronenoptischen Beobachtung von Plastiden, die nur Trägerlamellen enthalten, muß den lichtmikroskopisch beobachteten Plastiden mit 2 bis 5 Grana eine in der ontogenetischen Entwicklung höhere Stufe zugewiesen werden. Bei diesen Plastiden ist keine totale Hemmung der Sekundärgranabildung eingetreten, da sie noch im beschränkten Umfange und meist deutlich gestört und ungeordnet nachzuweisen war.

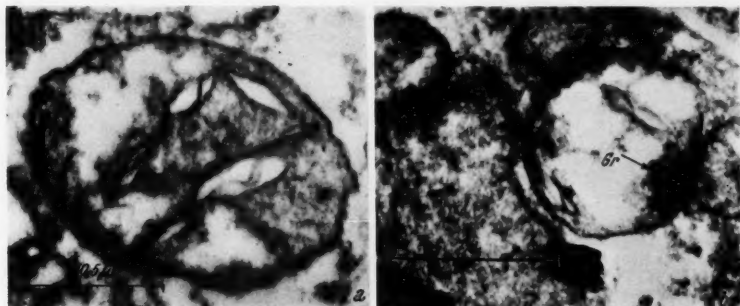


Abb. 14 a: STM-geschädigtes Plastid ohne Granum, wenig Stromaplasma und Lamellen.  $\text{OsO}_4/\text{Uranylacetat}$ ; Pr.-Vergr. 15.000fach. — Abb. 14 b: STM-geschädigtes Plastid ohne Granum. Auch Lamellen und Stromaplasma sind kaum vorhanden. Gr = osmiophile Granula.  $\text{OsO}_4/\text{Uranylacetat}$ ; Pr.-Vergr. 15.000fach.

### 5. Lichtmikroskopische Beobachtungen an reversibel geschädigten Plastiden

Zur Untersuchung gelangten Pflanzen, die drei Tage in Petrischalen mit einer STM-Lösung 1 : 50 000 in Leitungswasser zur Keimung gebracht und anschließend in Gartenerde weiterkultiviert wurden. Die Fixation erfolgte zu dem Zeitpunkt, da die Cotyledonen zu ergrünen begannen, was zwischen dem 13. und 15. Tage geschah. Die Plumula war noch nicht ausgewachsen und deutlich weiß. Da bei der angegebenen STM-Konzentration nur etwa ein Drittel der Pflanzen den beschriebenen Bedingungen folgte, mußte eine entsprechende Auswahl getroffen werden.

Gefärbte mediane Längsschnitte durch die Sproßachse zeigten einen Meristembereich, der sich in Lage, Form, Größe und Ausprägung der Einzelzellen nicht von denen der Kontrollen unterschied. Die nähere lichtmikroskopische Untersuchung ergab, daß im Urmeristem ausschließlich unigranuläre Proplastiden von amöboider Form, wie bei den Kontrollen, zu beobachten waren. Ihre Größe stimmte ebenfalls mit denen der Kontrolle überein. Auch im nachfolgenden Postmeristem wurden nur Formen von Plastiden mit einem Granum gefunden, die jedoch durchschnittlich etwas größer waren und ihre Amöboidie verloren hatten. Sie glichen damit morpho-

logisch den Plastiden, wie sie in irreversibel geschädigten Zellen gefunden wurden. An vergleichbaren loci der Kontrollen lagen hier häufig schon ausdifferenzierte Chloroplasten vor.

Der weitere Verlauf der Entwicklung war in den einzelnen Zellen sehr unterschiedlich. Im späten postmeristematischen Bereich wurden neben Zellen mit multigranulären Plastiden andere gefunden, die auffallend rund waren, einen Durchmesser von  $2\mu$  hatten und ein oder mehrere Grana erkennen ließen. Granalose Plastiden konnten nie beobachtet werden.

Alle aufgefundenen Plastiden waren reich an Stromaplasma, das sich diffus mit Eisenhämatoxylin und Lichtgrün färbte. Auch der Nachweis von Stärke konnte geführt werden; ihr Auftreten schien nicht geringer als in den Kontrollen zu sein.

## V. Elektronenoptisch analysierbare Strukturen unter STM-Einfluß

Mit dem Auftreten der STM-Chlorosen wurde regelmäßig ein Stagnieren im Wachstum der Pflanze beobachtet, dessen Reversibilität streng parallel zu jener bei den Chlorosen verlief. Daraus mußte gefolgert werden, daß die Wirkung des STM über eine Beeinflussung der Chloroplasten hinausging. Längsschnitte durch die Sproßachse STM-behandelter Pflanzen zeigten bereits eine Reduzierung und lichtmikroskopisch sichtbare Veränderung des Cytoplasmas der Meristemzellen.

An Ultradünnschnitten sollte nun versucht werden, cytomorphologisch definierbare Veränderungen, die durch den Einfluß von STM entstanden waren, herauszustellen. Als Material wurde das bei den Plastidenuntersuchungen angegebene Material und gleichaltrige Wurzelspitzen verwendet.

Die Chondriosomen zeigten einen sublichtmikroskopischen Feinbau, wie er erstmalig von Palade (1952) und später u. a. von Perner (1957), Heitz (1957) und Sitte (1958) für pflanzliche Zellen beschrieben wurde. In Zellen, die mit STM irreversibel geschädigt waren, konnten keine Anomalien der Chondriosomen festgestellt werden. Auch ihre Zahl war gegenüber den Kontrollen nicht deutlich verändert.

Die zuerst von Hodge und Mitarb. (1956) in pflanzlichen Zellen nachgewiesenen und von Strugger (1957 c) und Perner (1957 und 1958) beschriebenen Golgi-Apparate bestanden in den Zellen von *Sinapis alba* aus Paketen von vier bis acht Doppellamellen, die eine Länge von 0,3 bis  $1,0\mu$  hatten. In den Wurzelspitzen traten kürzere und dichter gepackte Lamellen auf als im Sproß. Postmeristematische Zellen fielen durch ihre großen Bläschen an den Enden der Golgi-Körper auf (vgl. Abb. 7); die Zahl der aufgefundenen Golgi-Körper war dort auch größer als in den Urmeristemzellen.

In den jüngsten Zellen irreversibel durch STM geschädigter Pflanzen ließen sich ebenfalls Golgi-Apparate nachweisen. Sie unterschieden sich von den in ungeschädigten Zellen beobachteten durch die lockere Schichtung der Lamellen, deren Zahl nie über fünf Doppellamellen lag. In Geweben, die



mit dem Postmeristem verglichen werden konnten, setzte dann Degeneration ein, in deren Verlauf sich die Lamellen voneinander trennten und frag-

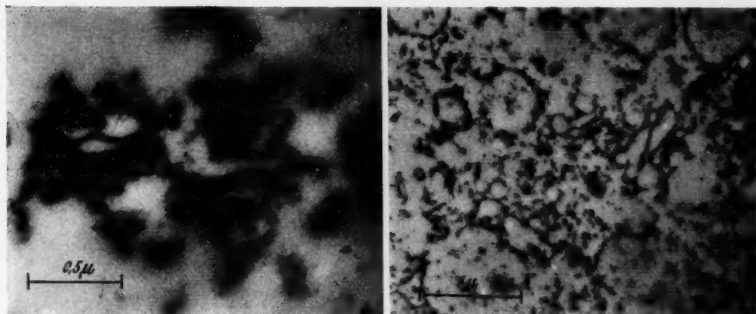


Abb. 15. Golgi-Apparate aus STM-geschädigten Zellen. Die Auflösung erfolgt durch fortschreitende Abblätterung der Doppelamellen.  $\text{OsO}_4$ /Uranylacetat. Pr.-Vergr. Abb. 15 a = 15.000fach, 15 b = 8000fach.

mentierten (Abb. 15). In älteren Zellen fanden sich nur sehr selten gut erhaltene Golgi-Apparate.

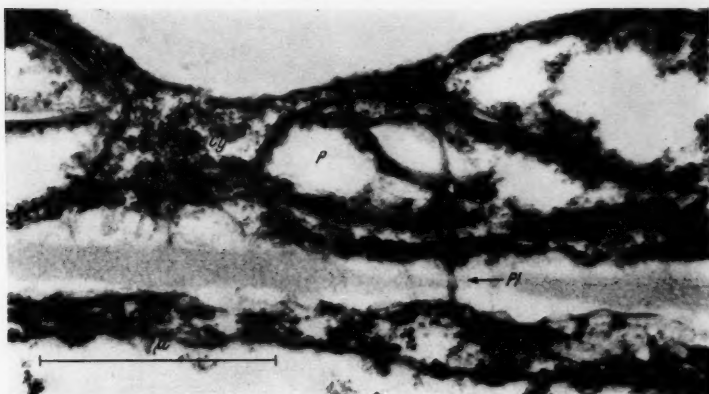


Abb. 16. Plasmawandbelag aus zwei irreversibel geschädigten älteren Zellen. P = Anschnitt eines  $2\mu$  großen Plastids mit Lamellenbündel, umgeben von wenig Stromaplasma. Cy = Cytoplasma mit charakteristisch ausgeprägten Cytonemata. Pl = Plasmodesmenverbindung aus kordelig gewundenen, langgestreckten fädigen Elementen.  $\text{OsO}_4$ /Uranylacetat; Pr.-Vergr. 15.000fach.

Die von Strugger (1956 b, 1957 c) beschriebenen Cytonemata als disperse Phase in einem elektronenoptisch hyalinen Dispersionsmittel konnten auch in allen Zellen von *Sinapis alba* beobachtet werden. Die von

Strugger für die Meristemzellen der Wurzelspitze von *Allium cepa* angegebenen Dimensionen trafen größenordnungsmäßig auch bei dem hier untersuchten Objekt zu. Die Mittelwerte aus 130 bis 150 Einzelmessungen ergaben für den Fadendurchmesser 150 bis 200 Å, für die Schraubendurchmesser 360 bis 400 Å und für die Ganghöhe 270 bis 300 Å.

In STM-geschädigten Zellen konnten die Cytonemata trotz des lichtmikroskopisch retikulären und vakuoligen Aspektes des Cytoplasmas ebenfalls kontrastreich dargestellt werden (Abb. 16). Ihre Anzahl war entsprechend der Ausprägung des gesamten Plasmas geringer, die Verteilung wie bei den Kontrollen statistisch isotrop. Messungen an 110 Cytonemata aus STM-geschädigten Pflanzen ergaben keine abweichenden Dimensionen zu den Kontrollen.

Der Nachweis von Plasmodesmen, der erstmalig von Strugger (1957 a) für Meristemzellen elektronenoptisch geführt werden konnte, gelang in Sproß- und Wurzelmeristemen gesunder und irreversibel durch STM geschädigter Pflanzen (Abb. 16). Ihre Durchmesser differierten erheblich und wurden zwischen 250 und 1000 Å ermittelt. Die weitaus größere Zahl jedoch ergab Werte zwischen 400 und 600 Å. Das Cytoplasma bestand hier aus kordelig gewundenen, langgestreckten fädigen Elementen.

## V. Lichtmikroskopische Untersuchungen des Mitoseverlaufes unter STM-Einfluß

### 1. Morphologische Veränderungen

Da Euler (1948) bereits zeigte, daß STM *in vitro* ein sehr gutes Fällungsmittel für Nucleoproteide ist, sollte nun durch die Beobachtung des Mitoseverlaufes unter STM-Einfluß cytologisch versucht werden, einen Hinweis auf die Wirkung der Nucleoproteidfällung zu bekommen und die Wachstumshemmung damit verständlich zu machen.

Für die Untersuchungen kam es darauf an, die ersten Stadien der Mitosestörungen unter Berücksichtigung des Phragmoplasten zu erfassen. Eine zeitliche Eingrenzung des STM-Einflusses erschien für die Beurteilung der Strukturen zu unsicher, weil der direkte Nachweis, wie weit eine Infiltration des STM stattfand, nicht möglich war.

Es wurden deshalb Konzentrationsabstufungen mit der Verdünnungsreihe 1 : 50 000, 1 : 10 000, 1 : 5000 und 1 : 1000 STM in Leitungswasser gewählt. Das entspricht dem Bereich von reversibler Hemmung bis zur irreversiblen Schädigung der Meristeme, ohne daß es zu Keimungshemmungen kommt. Die Samen wurden ungequollen in die STM-Lösung eingelegt, und die Wurzelspitzen regelmäßig nach 48 Stunden, wenn sie eine Länge von 5 bis 10 mm erreicht hatten, fixiert. Zur Fixierung wurden immer essigsäurefreie Gemische verwendet, da der sehr empfindliche Phragmoplast mit berücksichtigt werden sollte. Die Gemische nach Flemming-Heitz und Altmann haben sich auch bei der Beobachtung von Zellteilungen gut bewährt. Die Fixationszeiten wurden so gesteuert, daß das Optimum im Plerom lag, was im allgemeinen nach zehn bis zwölf Stunden der Fall

war. Für die Schnittdicke der über Äthylalkohol und Methylbenzoat in Paraffin eingebetteten Präparate wurden  $6\mu$  gewählt und Wert auf lange Schnittbänder gelegt, um angeschnittene Mitosen in den Nachbarschnitten wieder aufsuchen zu können. Eine Färbung erfolgte im allgemeinen mit Hilfe der Feulgen-Reaktion oder mit Eisenhämatoxylin nach Heidenhain.

Bei der Beurteilung von Mitosen von *Sinapis alba* war zu beachten, daß der in der Anaphase sich bildende Phragmoplast in normal ablaufenden Mitosen nie eine deutliche Vergrößerung seiner Struktur parallel zur Spindelachse zeigte, wenn mit essigsäurefreien Fixationsgemischen gearbeitet wurde (Abb. 17 a und b). Wie Porter (1958) an Mitosen bei *Allium cepa* zeigen konnte, ist im Bereich elektronenoptischer Dimensionierung im Phragmoplasten keine Längsorientierung sublichtmikroskopischer Strukturen zu erkennen. Artefakte durch essigsäurefreie Fixationsgemische in-

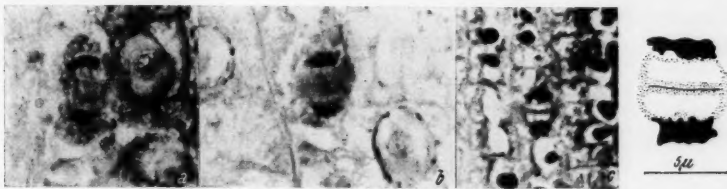


Abb. 17. Aspekt des Phragmoplasten in unbeeinflussten, essigsäurefrei fixierten Mitosen. Spindelparallel verlaufende, fibrilläre Stränge sind kaum noch zu erkennen. — Abb. 17 a: Anaphase. — Abb. 17 b: Telophase. Flemming-Heitz/Feulgen-Reaktion; Vergr. 1300fach. — Abb. 17 c: Telophase; durch zu kurze Fixationszeit ist das Chromatingerüst und der Phragmoplast stark geschrumpft, ohne daß spindelparallele Strukturen entstanden. Flemming-Heitz/Hämatoxylin n. H.; Vergr. 1000fach.

folge unzureichender Fixationsdauer führten zu Schrumpfungen dieser DNS-freien Komponente der Zellteilungsfigur, die an einer mehr oder weniger breiten, hellen Zone zwischen Tochterchromosomen und Phragmoplast erkennbar war (Abb. 17 c).

Wurzelspitzen von Samen, die in STM-Lösung verschiedener Konzentrationen gekeimt waren, zeigten im Mitoseablauf charakteristische Veränderungen. Von diesen Störungen wurden sowohl der Phragmoplast als auch die Chromosomen und ihr Spindelapparat betroffen. Schon bei niedrigen STM-Konzentrationen fanden sich Mitosen, deren Phragmoplast in der Anaphase fibrillär vergrößert parallel zur Spindelachse erkennbar war, was auch im Bereich optimaler Fixation immer wieder gefunden wurde (Abb. 18). Die Chromosomen in solchen Mitosen waren nicht verklebt und zeigten auch sonst lichtmikroskopisch keine Anomalien. Mit Erhöhung der STM-Konzentration traten immer häufiger morphologisch veränderte Phragmoplasten auf, die zu Störungen beim Einziehen der Zellplatte führten. Die Bildung der Primärmembran zwischen den beiden Tochter-

zellen verzögerte sich, und der Phragmoplast wurde nicht mehr aufgelöst, sondern blieb zusammen mit den Tochterkernen an der neuen Zellwand liegen. Erfolgt solche Zellteilungen in einem räumlich engbegrenzten

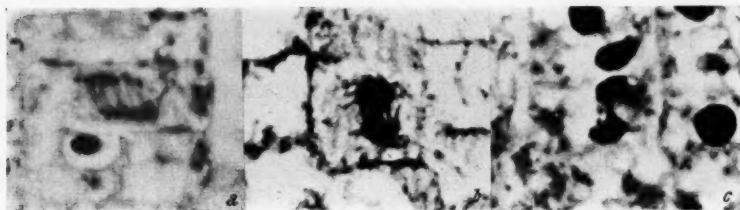


Abb. 18. Aspekt des Phragmoplasten in STM-geschädigten, essigsäurefrei fixierten Mitosen. Die plasmatische Komponente der Zellteilungsfigur zeigt in zunehmendem Maße eine fibrilläre Vergrößerung von vielen feinen bis zu wenigen kompakten Strängen. — Abb. 18 a und b: STM-Konzentration 1:5000; Flemming-Heitz/Hämatoxylin n. H.; Vergr. 1400fach. — Abb. 18 c: STM-Konzentration 1:1000; Vergr. 1700fach.

Bezirk nebeneinander, so bildeten sich über eine Gruppe von Zellen hinweg Kernpaare, die auch in ausdifferenzierten Geweben ihre Lage beibehielten (Abb. 19).



Abb. 19. Rindenparenchymzellen aus einer Wurzelspitze, die mit einer STM-Konzentration 1:10000 behandelt wurde. Im Bildausschnitt sind in einer Einstellebene 5 Kernpaare zu erkennen, die mit den Resten der nicht zurückgebildeten Phragmoplasten an der noch zur Ausbildung gekommenen Zellwand liegen. Flemming-Heitz/Hämatoxylin n. H.; Vergr. 1300fach.

Waren vom Phragmoplasten in der Anaphase nur noch wenige breite, stark verklebte Stränge zu sehen (Abb. 18 c), so wurde er vorzeitig aufgelöst, und es bildete sich keine Zellplatte. In den meisten Fällen traten auch

diese Störungen unabhängig von dem Teilungsmechanismus der Chromosomen auf, so daß es zur Ausbildung von zwei Tochterkernen kam, die in einer Zelle lagen (Abb. 20). Ob diese Zellkerne generell in der Lage sind

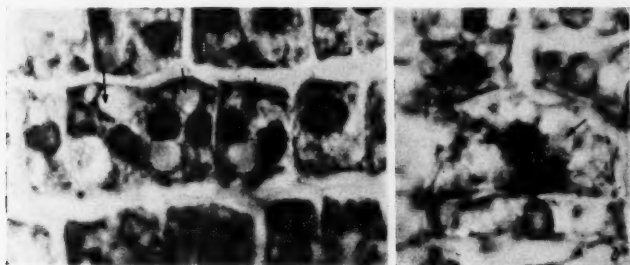


Abb. 20. Die neue Zellwand ist nicht mehr zur Ausbildung gekommen; es liegen zwei Interphasenkerne in einer Zelle. STM-Konzentration 1:5000; Flemming-Heitz/Feulgen-Reaktion. — Abb. 20 a: Vergr. 1250fach; — Abb. 20 b: Vergr. 1700fach.

sich weiter zu teilen, konnte nicht ermittelt werden. Doch wurde in zwei Fällen aus mehreren tausend untersuchten Mitosen aus STM-geschädigtem Material das Vorhandensein von zwei Anaphasen in einer Zelle beobachtet

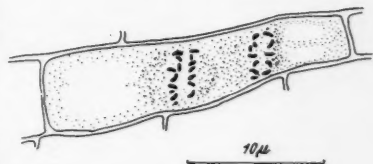


Abb. 21. Zwei frühe Anaphasen in einer Zelle. Näheres siehe Text. Die beigelegte Handzeichnung berücksichtigt zusätzlich noch Chromosomen, die im Nachbarschnitt der Serie aufgefunden wurden. Flemming-Heitz/Feulgen-Reaktion; Vergr. 1400fach.

(Abb. 21). Es waren jeweils langgestreckte, schmale Zellen. Ihrer Lage nach könnte es sich um Prokambiumelemente handeln, die wegen ihrer besonderen Teilungsaktivität am ehesten dazu neigen.

Morphologische Veränderungen in der Mitose, die auf Störungen im Spindelapparat und an den Chromosomen selbst schließen ließen, traten zahlenmäßig weniger in Erscheinung und waren nur geringen Grades.

An den Spindelfasern konnten lichtmikroskopisch keine morphologischen Anomalien ermittelt werden. Es ließen sich jedoch in der Anaphase Gruppenbildungen von Chromosomen beobachten oder das Nachhinken einzelner Chromosomen (Abb. 22 a), die aber später in den Tochterkern wieder mit einbezogen wurden.

Traten im Mitoseablauf Veränderungen an der chromatischen Substanz auf, so zeigten sie sich in der verspäteten Auflösung des Nucleolus in der Prophase sowie Verklebungen und vorzeitige Entschraubung in der Anaphase. Als schwerste beobachtete Störung fanden sich vereinzelt Kernfragmentationen (Abb. 22 b und c), die jedoch wie alle anderen beschriebenen Anomalien der chromatischen Substanz in jeder Konzentrationsstufe zu finden waren.

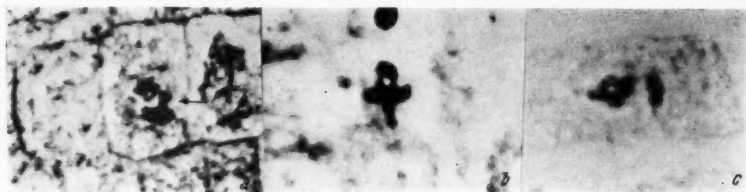


Abb. 22. STM-beeinflußte morphologische Veränderungen im Ablauf der Chromosomenteilung. STM-Konzentration 1:1000; Fix. Flemming-Heitz. — Abb. 22 a: „Nachhinken“ einzelner Chromosomen, Hämatoxylin n. H.; Vergr. 1100fach. — Abb. 22 b: Beginn einer Kernfragmentation; Hämatoxylin n. H.; Vergr. 1400fach. — Abb. 22 c: Kernfragmentation; Feulgen-Reaktion; Vergr. 2300fach.

Restitutionskernbildung, Absprengung von Chromosomengruppen oder Brückenbildung, wie sie von Tanaka und Sato (1952) nach STM-Behandlung an Wurzelspitzen von *Tradescantia* gefunden wurden, konnten nie beobachtet werden.

## 2. Die Abhängigkeit von der STM-Konzentration

Da die Zellteilungen in den Wurzelspitzen zeitlich ungeordnet verlaufen, mußte bei ihrer Auszählung und Aufteilung in zeitlich etwa gleichlange Abschnitte bei genügend großem Zahlenmaterial eine durch STM bedingte Verschiebung erkennbar werden.

Die Tabelle 1 gibt die Aufteilung aller ausgezählten Mitosen der einzelnen untersuchten STM-Konzentrationsstufen auf die vier Mitosestadien Pro-, Meta-, Ana- und Telophase wieder. Das zur Auszählung herangezogene Material stammte aus den Untersuchungen, die im vorigen Kapitel beschrieben wurden und war damit einheitlich 48 Stunden mit den verschiedenen STM-Lösungen behandelt und anschließend fixiert worden. Bei der Auswahl der Präparate wurde darauf geachtet, daß möglichst viele Wurzelspitzen herangezogen wurden, so daß die jeweils in Klammern angegebenen 290 bis 350 berücksichtigten Mitosen aus je 15 bis 22 Wurzel-



spitzen verschiedener Kultur- und Fixierungsserien gleicher Bedingungen stammten.

Tab. 1. Gesamtzahl der ausgewerteten Mitosen und ihre Aufteilung in die einzelnen Phasen der Karyokinese. Die in Klammern angegebenen Zahlen sind die absoluten Werte, der in den einzelnen Gruppen herangezogenen Mitosen, deren (P) Prophase-, (M) Metaphase-, (A) Anaphase- und (T) Telophaseanteil in Prozentsätzen angegeben sind.

STM-Konzentration		P	M	A	T
Kontrolle	(350)	30	25	24	21
1 : 50 000	(300)	30	25	23	22
1 : 10 000	(300)	21	27	27	25
1 : 5 000	(350)	22	27	20	31
1 : 1 000	(290)	13	21	31	35

Aus der Tabelle ist ersichtlich:

1. Die niedrigste der angewendeten STM-Konzentrationen ließ noch keine Verschiebung in den Mitoseanteilen erkennen. Trotz auftretender morphologischer Veränderungen (vgl. Tab. 2) war der mitosemechanische Ablauf nicht gehemmt.

2. Mit zunehmender STM-Konzentration sank die Zahl der gefundenen Prophasen, was indirekt als eine abnehmende Teilungsfähigkeit der Zellen gewertet werden kann.

3. Parallel zu dieser Verschiebung lief ein deutlicher Anstieg der Telophasen und in der Konzentrationsstufe 1 : 1000 auch ein solcher der Anaphasen. Sie müssen als eine Verlängerung des Zeitfaktors aufgefaßt werden, der durch STM induziert wurde.

Die Kenntnis von dieser zahlenmäßigen Verschiebung war außerdem notwendig, um ein Bezugssystem für den Anteil der geschädigten bzw. morphologisch veränderten Mitosen zu haben. Die Tab. 2 gibt die Verteilung der geschädigten Mitosen wieder.

Tab. 2. Anzahl der morphologisch veränderten oder gestörten Mitosen. Alle Zahlen sind Prozentsätze, die nach den Absolutwerten, die der Tabelle 1 zugrunde liegen, ermittelt wurden. (Zeichenerklärung s. Tab. 1. S = Summe aller gestörten Mitosen.)

STM-Konzentration	S	P	M	A	T
Kontrolle	3	0	0	6	4
1 : 50 000	9	3	6	17	14
1 : 10 000	19	4	17	31	21
1 : 5 000	28	6	28	29	44
1 : 1 000	40	12	42	46	43

Aus der Tabelle ist im einzelnen zu ersehen:

1. Erwartungsgemäß stieg die Gesamtzahl der geschädigten Zellteilungen mit der Zunahme der STM-Konzentration an. Sie erreichte aber selbst bei

der Konzentration, die als die höchst zulässige vor dem Beginn einer Keimungshemmung erkannt wurde, nur 40%.

2. Bei den Kontrollpflanzen wurden 3% Anomalien berücksichtigt, die auf geringe ana- und telophasische Störungen am Phragmoplasten zurückzuführen waren.

3. Im Gegensatz zu den nicht nachweisbaren Verschiebungen des zahlenmäßigen Anteils der einzelnen Mitosephasen in der geringsten angewendeten Konzentrationsstufe von 1:50 000 waren dennoch bereits 9% aller Zellteilungen verändert, besonders in der Ana- und Telophase.

4. Analog zu der zeitlichen Hemmung in der Telophase traten mit zunehmender STM-Konzentration die meisten morphologischen Veränderungen in der Schlußphase der Zellteilung auf.

5. Der prozentuale Anteil der Schädigung stieg auch in den einzelnen Phasen der Mitose nicht über 46%.

Um einen weiteren Einblick des Eingreifens von STM in den Zellteilungsablauf zu gewinnen, wurde die Tabelle 3 aufgestellt. Sie gibt die Verteilung der morphologischen Veränderungen in Gruppen zusammengefaßt, wie sie bereits besprochen wurden, auf die einzelnen Konzentrationsstufen wieder.

Tab. 3. Verteilung der verschiedenen morphologischen Ausprägungen der Mitosestörungen auf die einzelnen STM-Konzentrationen.

STM-Konzentration	A	B	C	D	E
1:50 000	41	18	0	27	14
1:10 000	38	6	4	36	13
1:5 000	9	36	25	9	21
1:1 000	20	24	9	15	31

Es bedeuten:

A = Vergrößerung der Strukturen im Phragmoplasten.

B = Mangelhafte Bildung der neuen Zellplatte bei telophasischen Tochterchromosomen.

C = Zwei echte Interphasenkerne in einer Zelle.

D = Spindelstörungen wie Nachhinken von Chromosomen usw.

E = Chromosomenverklebungen und Kernfragmentationen.

Alle Zahlen sind wieder Prozentsätze der Gesamtzahl gestörter Mitosen in den betreffenden Konzentrationsstufen. Die fehlenden Prozente auf 100 sind Störungen, die sich in dieses Schema nicht einordnen lassen, z. B. verspätete Auflösung des Nucleolus in der Prophase.

Aus dieser Aufstellung geht hervor:

1. Die Schädigung des Phragmoplasten und die Auswirkung auf die Bildung der neuen Zellwand sind abhängig von der STM-Konzentration (A, B und C). Die Verlagerung der Schädigungsform von einer Vergrößerung der Phragmoplastenstruktur bis zu zwei Interphasenkernen in einer Zelle bei steigender Konzentration ist ersichtlich. Pflanzen, die mit einer STM-Lösung 1:1000 behandelt wurden, sind aber nur noch in geringem

Maße in der Lage, echte Interphasenkerne unter diesen Bedingungen zu bilden.

2. Morphologische Veränderungen an der chromatischen Substanz treten vorwiegend in den höheren Konzentrationsstufen auf (E).

3. Morphologische Veränderungen, die durch eine Schädigung des Spindelapparates hervorgerufen werden, wie Gruppenbildung von Chromosomen oder das Nachhinken einzelner Chromosomen, scheinen in keinem Zusammenhang mit der STM-Konzentration zu stehen (D).

## VI. Streptomycin-Chlorosen an weiteren Angiospermen

STM-induzierte Chlorosen wurden zuerst von Euler (1948, 1953) und Euler und Stein (1955) als „Anti-Chlorophylleffekt“ an der Gerste und einigen *Cruciferen* wie Raps und Radieschen beschrieben. Auch Si-

Tab. 4. Tabelle der auf STM-Chlorosen untersuchten *Species*.

Positive Reaktionen noch bei STM-Konzentrationen

< 1 : 10 000	< 1 : 1000	> 1 : 1000
<i>Lepidium sativum</i>	<i>Pisum sativum</i>	<i>Vicia faba</i>
<i>Sinapis alba</i>	<i>Helianthus annuus</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Crepis tectorum</i>	<i>Avena sativa</i>
<i>Brassica napus</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Zea mays</i>
var. <i>arvensis</i>	<i>Nicotiana rustica</i>	<i>Tropaeolum majus</i>
<i>Poa trivialis</i>	<i>Agapanthus umbellatus</i>	( <i>Fagopyrum esculentum</i> )
<i>Lolium perenne</i>	<i>Digitalis purpurea</i>	
<i>Tradescantia albiflora</i>	<i>Arctium lappa</i>	
	<i>Plantago major</i> fol. Kapp.	
	<i>Chenopodium botrys</i>	
	<i>Reseda odorata</i>	
	<i>Bryophyllum tubifolium</i>	
	<i>Bryophyllum calycinum</i>	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
	<i>Myositis alpestris</i>	
	<i>Petroselinum hortense</i>	
	<i>Daucus carota</i>	
	<i>Eschscholtzia calif.</i>	
	<i>Amaranthus caudatus</i>	

gnol (1954) und Deken-Grenson (1955) wählten für ihre physiologischen bzw. cytologischen Untersuchungen die Gerste und erhielten STM-beeinflußte chlorotische Blätter. Gray (1955) erwähnt helle Flecken an Tomatenpflanzen, die mit einer STM-Lösung besprüht wurden und Dye (1956) beobachtete nekrotische und weiße Blätter an Pfirsich-Pflanzen, die in einer STM-Lösung standen.

Entsprechend der unterschiedlichen Thematik der aufgeführten Arbeiten gelangten auch unterschiedliche STM-Produkte und verschiedene Methoden zur Anwendung. Die vorliegenden cytologischen Untersuchungen an *Sinapis alba* ließen es jedoch als notwendig erscheinen, die STM-Chlorosen an

höheren Pflanzen mit einem einzigen STM-Produkt und einer einheitlichen Methode auf die Allgemeingültigkeit des Phänomens zu überprüfen.

Die angewandte Methodik stimmte mit den Methoden, die für die Untersuchungen an *Sinapis alba* Verwendung fanden, überein. Infolge der unterschiedlichen Keimungszeit der einzelnen Arten, die zwischen zwei und zehn Tagen lag, mußte auch die Anwendungsdauer für STM variiert werden. Von den *Bryophyllum*-Species wurden Brutknospen und von *Tradescantia albiflora* unbewurzelte und bewurzelte Stecklinge verwendet, die analog dem Samenmaterial behandelt wurden. Für sie wurde die STM-Einwirkungszeit von 3 Tagen gewählt. Chlorose induzierende Konzentrationen lagen dann vor, wenn 50% oder mehr der mindestens 100 Samen oder Pflanzen umfassenden Versuchsreihe den Effekt zeigten. Im einzelnen ergaben die an 32 Arten aus 18 Familien durchgeführten Versuche folgendes (s. Tab. 4):

1. Alle untersuchten Species bis auf eine Ausnahme (*Fagopyrum esculentum*) zeigten den Effekt der STM-Chlorose. Keimlinge von *Sinapis alba*, deren Samen 20 Minuten in eine STM-Lösung 1 : 1000 gebracht und nach gutem Abspülen getrocknet wurden, zeigten nach dem Auskeimen, was in Abständen von 14 Tagen erfolgte, von Charge zu Charge einen ständig abnehmenden Chlorose-Effekt, der nach etwa einem halben Jahr nicht mehr nachweisbar war, während frisches Saatgut in der aufbewahrten Lösung unter denselben Bedingungen den vollen Effekt zeigte.

2. In allen untersuchten Fällen trat spätestens zusammen mit der Chlorose eine Hemmung des Wachstums in Sproß und Wurzelmeristemen auf, die nur in wenigen Fällen reversibel war. Bei *Fagopyrum esculentum* wurde die Wachstumshemmung von Anomalien in der Ausbildung der Blattspreiten begleitet.

3. Die Wachstumshemmung war nicht von der Größe der zur Verfügung stehenden Assimilationsfläche abhängig. Dieses zeigte sich am deutlichsten bei der Brutknospenbehandlung von *Bryophyllum* und an den Stecklingen von *Tradescantia*. Aber auch in Nährsalzlösungen (nach Shive) bis zum 3.—5. Folgeblatt herangezogene Pflanzen von *Sinapis*, *Solanum*, *Pisum*, *Helianthus*, *Vicia* und *Tropaeolum* bildeten nach 2tägiger STM-Behandlung chlorotische Blätter, die nicht ausdifferenzierten. Die Pflanzen stellten ihr Wachstum ein und starben nach mehreren Wochen ab.

4. Die Abhängigkeit der STM-Chlorose von der angewendeten Konzentration ließ 3 Gruppen unterscheiden. Der weitaus größere Teil erreichte die definierte Grenzkonzentration zwischen 1 : 1000 und 1 : 5000 des angewendeten Antibiotikums in Leitungswasser. Daneben stand eine kleine Gruppe, bei der der Chlorose-Effekt nicht viel über der Konzentration lag, die für eine Hemmung der Keimung notwendig war. Eine weitere kleine Gruppe zeigte die Chlorose noch bei Verdünnungen unter 1 : 10 000. Am empfindlichsten reagierten *Lepidium sativum* (1 : 100 000) und *Sinapis alba* (1 : 70 0000).

5. Eine direkte Abhängigkeit zur Samengröße oder zur Stellung im System der Pflanzen bestand nicht.

6. Chlorotische Blätter entstanden nur durch Ausdifferenzierung STM-geschädigter Meristeme; grüne Blätter wurden nie sekundär chlorotisch. Das nachträgliche Ergrünen chlorotisch ausdifferenzierter Blätter wurde nur an Cotyledonen beobachtet.

## VII. Besprechung der Ergebnisse

Nach den bisherigen Untersuchungen des STM-Einflusses auf höhere Pflanzen standen biochemische und physiologische Versuchsanordnungen im Vordergrund. Eine gründlichere cytologische Bearbeitung, insbesondere der Plastidenentwicklung, erschien deshalb sowohl für eine Ergänzung des STM-Fragenkomplexes als auch für das Chloroplastenproblem zweckmäßig. Auch die Eigenschaft des STM, mit Nucleoproteiden schwer lösliche Verbindungen einzugehen, forderte zu einer näheren Analyse besonders der sublichtmikroskopischen Feinstruktur der Pflanzenzelle heraus.

Wie die Kulturversuche an 32 Arten höherer Pflanzen erkennen ließen, greift das STM in die Differenzierungsprozesse aktiver Meristeme ein. Für diese Tatsache ist die Hemmung des Wachstums in Sproß und Wurzel bei Unterdrückung der Ausbildung von Seitensprossen und -wurzeln charakteristisch, die in allen Altersstadien der Pflanze nachzuweisen war, ohne Rücksicht darauf, wie groß die vorhandene Assimilationsfläche war. Bei beginnender Blütenbildung konnte der STM-Einfluß schlechter induziert werden, da die schon sehr früh differenzierten Blütenanlagen noch heranwuchsen.

Für den Ablauf der Karyokinese wurden lichtmikroskopisch sowohl eine zeitliche Hemmung des Mitoseablaufes als auch morphologische Veränderungen der Teilungsfiguren beobachtet. Die geringere Anfälligkeit DNS-haltiger Strukturen gegenüber STM im Vergleich zu Phragmoplast und zellwandbildendem Cytoplasma trat deutlich hervor. Bereits Euler und Heller (1948) zeigten bei Fällungsversuchen nucleinsäurehaltiger Substanzen mit STM den Vorrang der RNS gegenüber der DNS.

Die beschriebenen Formen der Plastidenhemmung ließen sich nicht allein mit der von Euler (1950) vermuteten Blockierung eines am Aufbau des Chlorophylls beteiligten Enzymes erklären. Obwohl bei der üblichen cytologischen Präparation des Materials eine exakte Lokalisierung des Chlorophylls wegen seiner Löslichkeit wahrscheinlich nicht möglich ist (Mühlethaler 1956), sprechen eine Reihe von Indizien für die Vermutung, daß primär die Nucleoproteidstrukturen der Plastiden durch STM in Mitleidenschaft gezogen wurden. Da sowohl für das Primärgranum als auch für das Stroma-plasma von Spiekermann (1957) der Nachweis für Nucleoproteide geführt wurde, bestehen keine Bedenken, die Störungen im Lamellensystem und die mangelhafte Ausbildung von Stroma-plasma unter dem Einfluß von STM auf eine Reaktion mit dieser Substanz zurückzuführen. Das Auswachsen der ersten Trägerlamellen aus dem Primärgranum unterlag dabei einer geringeren Anfälligkeit als die Reduplikation der Lamellen und die Produktion von Sekundärgrana. Die primäre Rotfluoreszenz in lichtmikroskopisch granalosen Plastiden ließ eine Hemmung der Chloro-

phyllsynthese über die beschriebenen Veränderungen der sublichtmikroskopischen Feinstruktur hinaus unwahrscheinlich erscheinen. Morphologische Veränderungen an der Struktur der Primärgrana waren nicht zu erwarten gewesen. Wegen ihrer Persistenz (Strugger 1950) haben sie nach Eintritt der STM-Wirkung keinen Formwechsel durchgemacht, während eine chemische Anlagerung des Antibiotikums auch sublichtmikroskopisch nicht nachweisbar ist.

Die immer wieder beobachteten und beschriebenen osmiophilen Granula fanden sich in kaum verminderter Häufigkeit auch in den STM-geschädigten Plastiden. Bemerkenswert war ferner, daß das Wachstum des gesamten Plastids nicht in dem starken Maße gehemmt war wie seine Feinstruktur. Plastiden, die kaum Stroma-Plasma und nur wenige Lamellen enthielten, erreichten noch Größen, die drei Viertel der normalen Plastidengrößen ausdifferenzierter Chloroplasten betrug.

Eine analoge Beobachtung konnte an STM-behandelten Meristemzellen gemacht werden, in denen eine Volumenzunahme der Zellen ohne entsprechende Substanzvermehrung des Cytoplasmas stattfand. Deshalb waren in irreversibel durch STM geschädigten Pflanzen mit nicht mehr teilungsfähigem Meristem jene Zellen größer und plasmaärmer als Meristemzellen gesunder Pflanzen.

Für die reversible Hemmung durch eine geringe STM-Konzentration muß der gleiche Wirkungsmechanismus angenommen werden. Das Prinzip der Reversibilität ist, wie die statistische Auswertung gestörter Mitosen zeigte, auf eine geringe partielle Schädigung der Zellen zurückzuführen. Daneben mußte aber auch die Möglichkeit eines Abbaues des STM in der Zelle in Erwägung gezogen werden. So zeigten Keimlinge, die als Samen nach der STM-Behandlung wieder getrocknet und erst nach längerer Zeit zum Keimen gebracht wurden, keine STM-Chlorose mehr. Auch die lichtmikroskopische Untersuchung an den Plastiden reversibel geschädigter Pflanzen erbrachte nicht den Nachweis einer Schädigung, was durch die Funktionstüchtigkeit in Form von Stärkebildung unterstrichen wurde.

Die cytologischen Untersuchungen an STM-geschädigten Pflanzen von *Sinapis alba* haben somit eine weitere Bestätigung für die Wahrscheinlichkeit einer Blockierung von Nucleoproteiden durch das Antibiotikum erbracht, ohne daß die Möglichkeit anderer Wirkungsmechanismen ausgeschaltet werden konnte.

### Zusammenfassung

1. Die experimentell unbeeinflusste Ontogenese der Chloroplasten von *Sinapis alba* folgte dem Schema, wie es von Mühlethaler (1956) aufgestellt wurde, indem vom Primärgranum aus Züge von Doppellamellen das Plastid erfüllen, auf denen zu annähernd gleicher Zeit an gleichen Orten übereinander die Sekundärgranalamellen sich bildeten. Das Primärgranum zeigte eine zu den Sekundärgrana unterschiedliche Struktur. Es



bestand aus reihenweise angeordneten homogen osmio- und uranophilen „Elementareinheiten“ mit einem Durchmesser unter 100 Å.

2. Die Plastidenentwicklung in den Blattanlagen von Pflanzen, die durch STM-Einwirkung chlorotisch und nicht ausdifferenziert waren, konnten als Endstadium ihrer Entwicklung alle Übergänge zwischen unigranulären Formen und Jungplastiden mit beginnender Sekundärgranabildung erreichen. Die Zahl der Trägerlamellen und die Ausbildung des Peristromiums war reduziert. Das Primärgranum zeigte keine Anomalien. Eine distinkte oder diffuse primäre Rotfluoreszenz war stets nachweisbar.

3. Im sublichtmikroskopischen Feinbau STM-geschädigter Zellen ließen sich an den Chondriosomen keine Veränderungen nachweisen. Golgi-Apparate wurden durch Abblätterung ihrer Doppellamellen aufgelöst. Die von Strügger (1956 b, 1957 c) beschriebenen Cytomemata waren bei verminderter Zahl nachweisbar.

4. Die Zellteilungen in den Wurzelspitzen zeigten lichtmikroskopisch Schädigungen, die in der Zahl und Ausprägung von der STM-Konzentration abhängig waren. Am anfälligsten gegen das STM erwies sich der Phragmoplast.

5. Die Untersuchungen an STM-geschädigten Pflanzen von *Sinapis alba* haben cytologisch eine Bestätigung für die Wahrscheinlichkeit einer Blockierung von Nucleoproteiden durch das Antibiotikum erbracht, wie es von Euler und Heller (1948) in vitro nachgewiesen wurde. Die Möglichkeit anderer Wirkungsmechanismen konnte jedoch nicht ausgeschaltet werden.

#### Literatur

- Böing, J., 1955: Vitaluntersuchungen über die Kontinuität der Granastrukturen in den Chloroplasten von *Helodea densa*. Protoplasma 45, 55.
- Bracco, M., und H. v. Euler, 1947: Kemiska Arbeten, Ny följd. Bd. II, Nr. 10. Zitiert nach: H. v. Euler, 1948 (s. u.).
- Deken-Grenson, M. de, 1955: Action de la streptomycine sur la formation des chloroplastes. Biochim. et Biophys. Acta 17, 35.
- Dube, J. F., 1952: Observations on a chlorophyll-deficient strain of *Chlorella vulgaris* obtained after treatment with streptomycine. Science (L. P.) 116, 278.
- Dye, M. H., 1956: Studies on the uptake and translocation of Streptomycin by *Peach* Seedlings. Ann. appl. Biol. 44, 567.
- 1956: Intake of Streptomycin by *Peach* Leaves. Nature 178, 551.
- Euler, H. v., 1948: Beobachtungen über biologische und chemische Wirkungen des Streptomycins. Arkiv Kemi (Mineral. Geol.), Bd. 26 A, No. 6.
- 1950: Einfluß von Streptomycin auf Samen normaler und chlorophylldefekter Gerste. Z. Naturforsch. 5 b, 448.
- 1953: Einfluß von Streptomycin und Dihydro-streptomycin auf keimende Samen grüner Pflanzen. Hoppe-Seylers Z. 295, 411.
- 1956: Einfluß chemisch definierter Stoffe auf die Entwicklung keimender Samen und auf Tumore. Arkiv Kemi (Mineral. Geol.) 9, 1.
- und L. Heller, 1948: Schonende Darstellung der zytoplasmatischen Nucleoproteide mittels Streptomycin und anderen Fällungsmitteln. Arkiv Kemi (Mineral. Geol.), Bd. 26 A, No. 10.

- Euler, H. von, und L. Heller, 1950: Biochemische Wirkungen des Streptomycins und des Streptidins. *Arkiv Kemi (Mineral. Geol.)* 1, 293.
- und M. L. Stein, 1955: Einfluß von Streptomycin und von Terracyclinen auf die Entwicklung keimender Samen. *Experientia* 11, 108.
- Fasse-Franzisket, U., 1955: Die Teilung der Proplastiden und Chloroplasten bei *Agapanthus umbellatus* L'Herit. *Protoplasma* 45, 194.
- Giuliano, G., M. L. Stein und H. v. Euler, 1954: Die Fällung von Nucleoproteiden, Nucleinsäuren und Nucleotiden durch Streptomycin. *Arkiv Kemi (Mineral. Geol.)* 6, 565.
- Grave, G., 1955: Studien über die Entwicklung der Chloroplasten bei *Agapanthus umbellatus*. *Protoplasma* 44, 273.
- Gray, A. R., 1955: Inhibition of root growth by Streptomycin and reversal of the inhibition by Manganese. *Amer. J. Bot.* 42, 327.
- Guttenberg, H. v., 1948: Studien über die Entwicklung des Wurzelvegetationspunktes der *Dikotyledonen*. *Planta* 35, 360.
- Heitz, E., 1956: Kristallgitterstruktur in den jungen Chloroplasten einer *Dikotyledonen*. *Experientia* 12, 476.
- 1957: Die Struktur der Chondriosomen und Plastiden im Wurzelmeristem von *Zea Mays* und *Vicia Faba*. *Z. Naturforsch.* 12 b, 283.
- Hodge, A. J., J. D. McLean and F. V. Mercer, 1955: Ultrastructure of the Lamellae and Grana in the Chloroplasts of *Zea Mays* L. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 1, 605.
- — 1956: A possible mechanism for the morphogenesis of lamellar systems in plant cells. *J. Biophysic. a. Biochem. Cytol.* 2, 597.
- Höhn, K., 1954: Die Bedeutung der Nucleinsäuren für embryonale und postembryonale Wachstumsvorgänge der Pflanze. *Naturwiss.* 41, 536.
- Kaja, H., 1956: Untersuchungen über die Struktur und Entwicklung der Leucoplasten in der Epidermis von *Chlorophytum comosum*. *Protoplasma* 47, 280.
- Leyon, H., 1954: The Structure of Chloroplastes. VI. The Origin of the Chloroplasts laminae. *Exper. Cell Res.* 7, 606.
- Meyer, A., 1885: Das Chlorophyllkorn in chemischer, morphologischer und biologischer Beziehung. Leipzig.
- Mühldorf, A., 1951: Die Zellteilung als Plasmateilung. Springer, Wien.
- Mühlethaler, K., 1956: Untersuchungen über die Struktur und Entwicklung der Proplastiden. *Protoplasma* 45, 264.
- 1957: Der gegenwärtige Stand der elektronenmikroskopischen Erforschung der Pflanzenzelle. *Naturwiss.* 44, 204.
- Némec, B., 1906: Über inverse Tinktion. *Ber. dtsch. bot. Ges.* 24, 528.
- Palade, G. E., 1952: The Finestructure of mitochondria. *Anatom. Rec.* 114, 427.
- Perner, E. S., 1956: Die ontogenetische Entwicklung der Chloroplasten von *Chlorophytum comosum*. *Z. Naturforsch.* 11 b, 560 und 567.
- 1957: Zum elektronenmikroskopischen Nachweis des „Golgi-Apparates“ höherer Pflanzen. *Naturwiss.* 44, 336.
- 1958: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Cytomorphologie des sogenannten „Golgisystems“ in Wurzelzellen verschiedener *Angiospermen*. *Protoplasma* 49, 407.
- Porter, K. R., 1958: A review of progress in the study of nuclear fine structure. 4. Internationaler Kongreß für Elektronenmikroskopie, Berlin.
- Pramer, D., 1954: The Movement of Chloramphenicol and Streptomycin in Broad Bean and Tomato Plants. *Annal. Bot.* 18, 463.

- Pramer, D., 1956: Absorption of antibiotics by plant cells. II. Streptomycin. Arch. Biochem. Biophysics 62, 265.
- Provasoli, L., S. H. Hutner and A. Schatz, 1948: Streptomycin-Induced Chlorophyll-less Races of *Euglena*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 69, 279.
- — and I. Pintner, 1951: Destruction of Chloroplasts by Streptomycin. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology XVI, 113.
- Romeis, B., 1948: Mikroskopische Technik. 15. Aufl. Leibniz, München.
- Sager, R., and G. E. Palade, 1957: Structure and development of the chloroplast in *Chlamydomonas*. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. 3, 463.
- Schimper, A. F. W., 1885: Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. Bot. Ztg. 41, 105.
- Signol, M., 1954: Étude des modifications cytologiques induites par la dihydrostreptomycine chez les plantules d'Orge. C. r. soc. biol. Paris 148, 263.
- Sitte, P., 1958: Die Ultrastruktur von Wurzelmeristemzellen der Erbse. Protoplasma 49, 447.
- Spiekermann, R., 1957: Cytochemische Untersuchungen zum Nachweis von Nucleinsäuren in Proplastiden. Protoplasma 48, 303.
- Steinmann, E., und F. S. Sjöstrand, 1955: The ultrastructure of chloroplasts. Exper. Cell Res. 8, 15.
- Stich, H., 1951: Das Vorkommen von RNS in Kernsaft und Spindel sich teilender Kerne von *Cyclops strenuus*. Z. Naturforsch. 6 b, 259.
- Strugger, S., 1940: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Jena. Zeitschr. Naturwiss. 73, 97.
- 1947: Die Vitalfluorochromierung des Protoplasmas. Naturwiss. 34, 267.
- 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- 1950: Über den Bau der Proplastiden und Chloroplasten. Naturwiss. 37, 166.
- 1951: Die Strukturordnung im Chloroplasten. Ber. dtsh. bot. Ges. 64, 69.
- 1953: Über die Struktur der Proplastiden. Ber. dtsh. bot. Ges. 66, 439.
- 1954 a: Die Proplastiden in den jungen Blättern von *Agapanthus umbellatus* L'Herit. Protoplasma 43, 120.
- 1954 b: Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis des primären Granums in den Proplastiden. Naturwiss. 41, 286.
- 1956 a: Die Uranylacetat-Kontrastierung für die elektronenmikroskopische Untersuchung von Pflanzenzellen. Naturwiss. 43, 337.
- 1956 b: Schraubig gewundene Fäden als sublichtmikroskopische Strukturelemente des Cytoplasmas. Naturwiss. 43, 451.
- 1957 a: Der elektronenmikroskopische Nachweis von Plasmodesmen mit Hilfe der Uranylimprägnierung an Wurzelmeristemen. Protoplasma 48, 231.
- 1957 b: Elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Proplastiden des Vegetationskegels von *Elodea densa*. Protoplasma 48, 360.
- 1957 c: Schraubig gewundene Fäden als sublichtmikroskopische Bauelemente des Cytoplasmas. Ber. dtsh. bot. Ges. 70, 91.
- 1957 d: Elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Plasmodesmen des Wurmeristems der Wurzelspitze von *Allium cepa*. Ein Beitrag zur Kritik der Fixation und zur Beurteilung elektronenmikroskopischer Größenangaben. Protoplasma 48, 365.
- 1957 e: Der elektronenmikroskopische Nachweis von Plasmodesmen mit Hilfe der Uranylimprägnierung an Wurzelmeristemen. Protoplasma 48, 231.

- Strugger, S., und E. S. Perner, 1956: Beobachtungen zur Frage der ontogenetischen Entwicklung des somatischen Chloroplasten. *Protoplasma* 46, 711.
- Tanaka, H., and M. Satô, 1952: Effects of streptomycin on the mitotic cells of *Tradescantia paludosa*. *Cytologia* 17, 124.
- Tschermak-Woess, E., 1954: Über die Phasen der Endomitose, Herkunft und Verhalten der „nuclealen Körper“ und Beobachtungen zur karyologischen Anatomie von *Sauromatum guttatum*. *Planta* 44, 509.
- Tunmann, O., und L. Rosenthaler, 1951: Pflanzenmikrochemie. 2. Aufl. Borntraeger, Berlin.
- Vávra, J., 1956: The action of streptomycin on the flagellate *Euglena gracilis* Klebs. *Fol. Biol.* 2, 351.
- 1957: The action of streptomycin on chloroplasts of flagellate *Euglena gracilis* Klebs. *Fol. Biol.* 3, 108.
- Winter, A. G., und L. Willeke, 1951: Über die Aufnahme von Antibiotica durch höhere Pflanzen und ihre Stabilität in natürlichen Böden. *Naturwiss.* 38, 457.

# Feinbau und Teilung bei Plastiden einiger Florideen-Arten

Von

**Konstantinos Mitrakos**

Aus dem Botanischen Institut der Universität Thessaloniki

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. Februar 1960)

## Einführung

Die Plastidenform der Rhodophyceen ist durch zahlreiche lichtmikroskopische Untersuchungen gut bekannt (vgl. K y l i n 1937, 1954, D r e w 1951). So besitzen die Bangiaceen-Zellen nur einen einzigen, sternförmigen Plastiden. Die Florideen enthalten mehrere Plastiden pro Zelle, wobei zwischen bandförmigen und linsenförmigen alle Übergänge vorkommen. Während die Plastiden der Bangiaceen immer ein Pyrenoid enthalten, ist dies bei den Florideen nur ausnahmsweise der Fall.

Unsere Kenntnisse über den Feinbau dieser Plastiden sind immer noch beschränkt. Auch die Anwendung des UV-Mikroskopes (vgl. H ö f l e r 1956) und andere Methoden der Protoplasmatik (B i e b l 1956, 1959) haben nicht weitergeholfen, so daß bis in die neueste Zeit einerseits die kolloidchemische Auffassung von L i e b a l d t (1915) über den Aufbau der Plastiden vertreten wurde, während andere Autoren eine Struktur aus Granen und Stroma, wie sie den höheren Pflanzen eigen ist, annahmen (K y l i n 1954, H ö f l e r 1956).

Neulich haben B r o n d y und V a t t e r Untersuchungen über die Feinstruktur von *Porphyridium cruentum* mitgeteilt. Die Gattung *Porphyridium* gehört zu den niedrigen Bangiaceen; was gewisse Autoren zwar bezweifeln (vgl. K y l i n 1937). Ihre Plastiden besitzen wie bei anderen Algen Lamellen-Struktur. Über die Feinstruktur der Plastiden der entwicklungsgeschichtlich höher stehenden Florideen sind nur die Angaben von M y e r s, P r e s t o n und R i p l e y (1956) bekannt. In der vorliegenden Arbeit habe ich die Feinstruktur und die Teilungsmodi von Plastiden einiger Florideen-Arten elektronenmikroskopisch untersucht.

### Material und Methodik

Die untersuchten Arten sind entsprechend ihrer phylogenetischen Entwicklungsstufe aufgezählt: 1. *Rhodochorton floridulum*, 2. *Trailliella intricata*<sup>1</sup>, 3. *Gracilaria* sp., 4. *Plocamium coccineum*, 5. *Gigartina Teedii* und 6. *Polysiphonia nigrescens*.

*Gigartina Teedii* und *Gracilaria* sp., sind im März 1959 im Golf von Thessaloniki (Thermaikos), Griechenland, gesammelt und in Meerwasser nach Zürich gebracht worden. Sie wurden 60 Stunden nach dem Sammeln in 2% gepufferter  $\text{KMnO}_4$ - (pH 7,2)-Lösung 4 Stunden lang fixiert. Zur Entwässerung wurde Aceton verwendet. Die kleinen Thallusstücke wurden über Nacht in einer Lösung von 1% Phosphorwolframsäure + 1% Uranylacetat in 70% Aceton kontrastiert. Einbettung in Araldit. Die übrigen Arten stammen von Helgoland<sup>2</sup> und wurden unmittelbar nach dem Sammeln fixiert und eingebettet. Zur Fixierung diente folgendes Gemisch: Lösung A (nach Zettrqvist, 1956; Na-Acetat 9,714 g, Veronal-Natrium 14,714 g, und dest. Wasser bis 500 ml); 3 ml, 0,1 n HCl; 2,4 ml,  $\text{KMnO}_4$ ; 0,25 g, und Meerwasser bis 25 ml. Das Fixiermittel wies ein pH von 7,6, einen osmotischen Wert von 20,7 at. auf. Die entsprechenden Werte für das Meerwasser von Helgoland sind 7,9 und 21,6. Die Fixierdauer betrug 30–60 Minuten. Zur Entwässerung wurden Gemische von Meerwasser, Alkohol und dest. Wasser verwendet. Das Kontrastmittel wirkte 7 Stunden ein. *Rhodochorton floridulum*, *Trailliella intricata* und *Plocamium coccineum* sind in Araldit eingebettet worden, *Polysiphonia nigrescens* in Methacrylat (Butyl-Methacr. : Methyl-Methacr. 8 : 2).

Von den erwähnten Arten wurde *Gigartina Teedii* besonders eingehend untersucht. Die Anatomie der Gattung *Gigartina* ist von Olson (1899), Humphrey (1901), Sjöstedt (1926) und Kylin (1930) beschrieben worden. Die plastidenreichen Rindenzellen des Thallus waren für unsere Fragestellung besonders geeignet; deshalb habe ich Quer- und Längsschnitte der äußeren Schicht sowohl der Haupt- als auch der Nebenäste untersucht.

### Ergebnisse und Diskussion

Die Zellen aller erwähnten Florideen, von den phylogenetisch niedrigen (*Rhodochorton floridulum*) bis zu den höheren (*Polysiphonia nigrescens*) lassen leicht multilamellierte Gebilde erkennen, die den Plastiden anderer Kryptogamen grundsätzlich ähnlich sind (Steinmann 1952, Wolken und Palade 1953, Albertsson und Leyon 1954, Leyon und Wettstein 1954, Sager und Palade 1957, Brondy und Vatter 1959). Sie sind gegen das Grundzytoplasma durch eine deutliche Membran abge-

<sup>1</sup> Harder and Koch (1949) *Trailliella intricata* ist identisch mit *Bonnemaisonia hamifera*.

<sup>2</sup> Dr. P. Kornmann, Dr. H. Kessler und Herrn Sahling der Biologischen Anstalt Helgoland bin ich für Hilfe während der Sammlung und Bestimmung der Arten zu großem Dank verpflichtet.



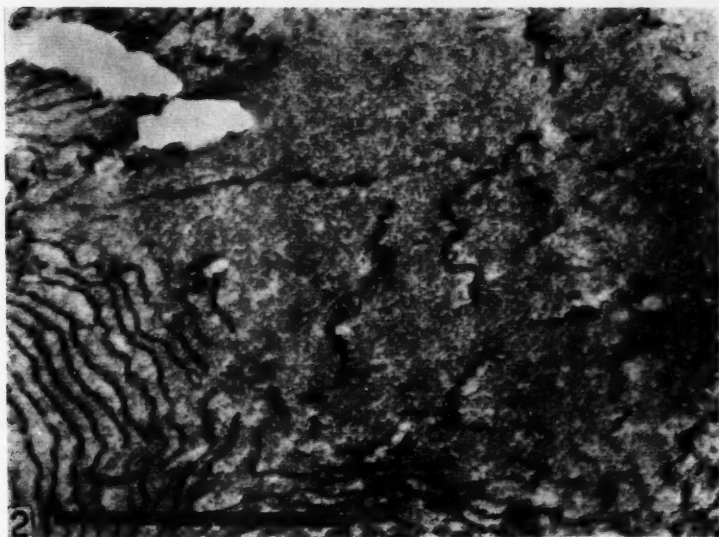
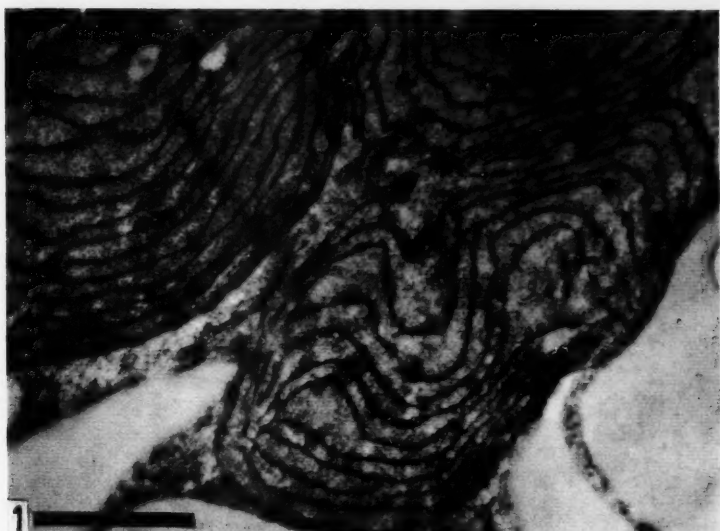


Abb. 1. *Trailliella intricata*, ausgewachsene Plastiden. Vergr. 31.500  $\times$ .

Abb. 2. *Rhodochorton floridulum*, Gebiet eines Pyrenoids. Vergr. 54.000  $\times$ .

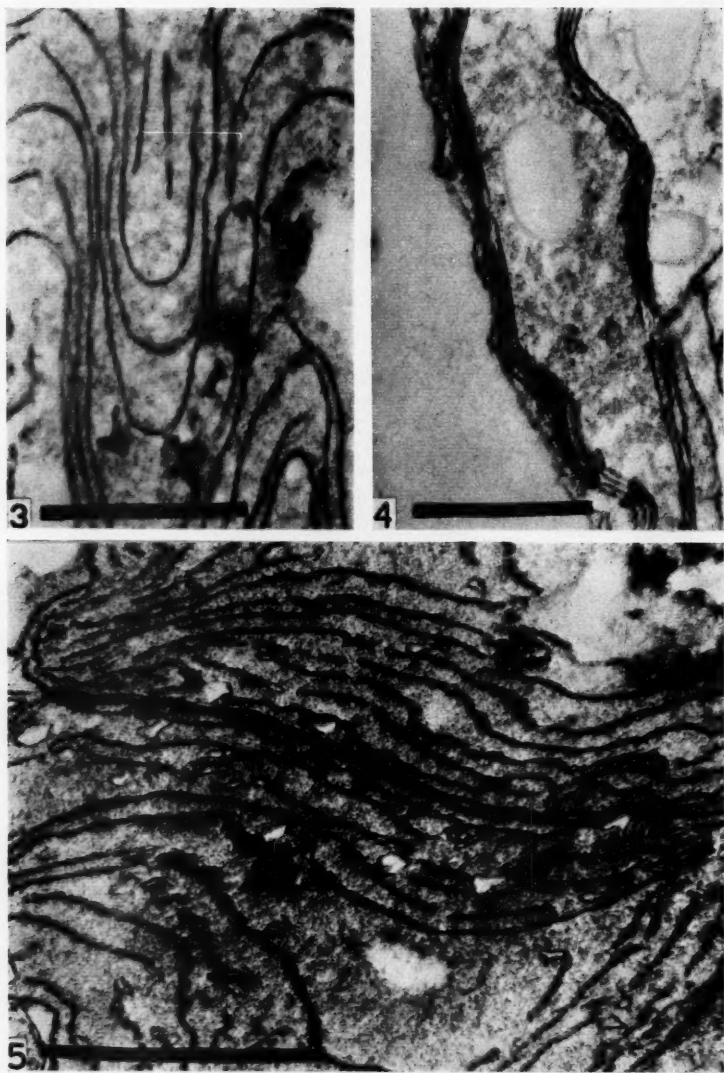


Abb. 3. *Gigartina Teedii*, weiteres Stadium einer Lamellen-Ausbuchtung.  
Vergr. 40.000  $\times$ .

Abb. 4. *Gigartina Teedii*, Plastid in frühem Entwicklungsstadium. Vergr. 54.000  $\times$ .

Abb. 5. *Gigartina Teedii*, Endstadium einer Plastidenteilung. Vergr. 54.000  $\times$ .

grenzt. Im ausgewachsenen Zustand liegen 10–15 Doppel-Lamellen, die unter sich einigermaßen parallel verlaufen, in einem körnigen, weniger elektronendichten Stroma. In Tab. I ist die durchschnittliche Dicke der Doppel-Lamellen ausgewachsener Plastiden zusammengestellt.

Tab. 1. Durchschnittliche Dicke der Doppel-Lamellen in *A*.

1. <i>Rhodochorton floridulum</i> . . . . .	250 ± 33,39
2. <i>Trailiella intricata</i> . . . . .	116 ± 22,53
3. <i>Gracilaria</i> sp. . . . .	145 ± 28,60
4. <i>Gigartina Teedii</i> a) . . . . .	159 ± 21,67
b) . . . . .	150 ± 21,52
5. <i>Polysiphonia nigrescens</i> . . . . .	96 ± 3,30

Reife Plastiden von *Gigartina Teedii* enthalten etwa 10 Doppel-Lamellen. Gebilde, die weniger Lamellen zählen und ein Florideenstärkekorn aufweisen, betrachte ich als frühe Entwicklungsstadien von Plastiden (Abb. 4). Eine Vermehrung der Lamellen im Verlauf der Plastiden-Entwicklung hat v. Wettstein (1954) bei *Fucus vesiculosus* beobachtet.

Aus lichtmikroskopischen Beobachtungen von Einschnürungsfiguren an Plastiden schloß man auf ihre Teilung. Die elektronenmikroskopische Untersuchung zeigt überdies, daß verschiedene Teilungsmodi möglich sind, indem aus einem Plastiden zwei oder mehrere Tochterplastiden entstehen können (Abb. 6, vgl. auch v. Wettstein, 1954). Sowohl ausgewachsene wie jüngere Plastiden sind teilungsfähig. Teilung von Zellorganellen gleichzeitig in mehreren Abschnitten hat Mühlethaler (1958) an Mitochondrien junger *Elodea*-Zellen beobachtet.

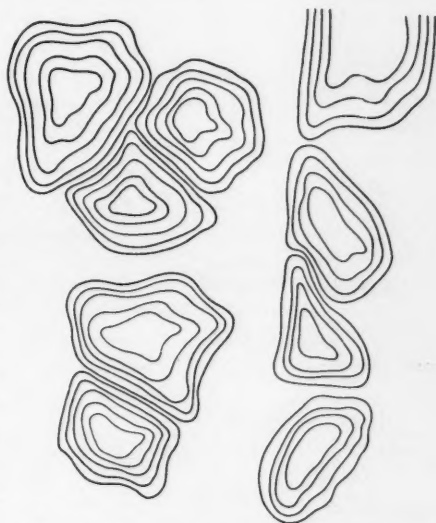


Abb. 6. Schematische Darstellung von Endstadien verschiedener Plastiden-Teilungsmodi bei *Gigartina Teedii*.

Bei *Gigartina Teedii* fand ich Bilder, die ich als verschiedene Stadien eines Teilungsprozesses deute. Am Anfang des Prozesses beginnt sich das Lamellenpaket nach einer Richtung auszubuchten. Später verstärkt sich diese Ausbuchtung, wobei manchmal eine Neubildung von Lamellen stattfindet (Abb. 3). Infolge Durchschnürung kommt es zur Teilung des Plastiden. Unmittelbar vor und nach der Teilung des Plastiden verlaufen die Lamellen

der Tochterplastiden parallel zur Teilungslinie (Abb. 5). Der Prozeß verläuft ähnlich wie bei *Fucus vesiculosus* (v. Wettstein 1954).

Von den untersuchten Arten enthalten die Plastiden von *Rhodochorton floridulum* ein Pyrenoid. Jede ihrer Zellen enthält mehrere unregelmäßig geformte Plastiden, mit einem schon lichtmikroskopisch erkennbaren Pyrenoid. Es enthält weniger Lamellen als der Rest des Plastiden. Seine Lamellen setzen sich in jene der dichteren Lamellen-Pakete außerhalb der Pyrenoide fort. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Leyon (1954) und Brondy und Vatter (1959).

Florideen-Stärkekörner finden sich in allen Zellen. In Zellen mit ausgewachsenen Plastiden liegen sie meistens außerhalb im Grundzytoplasma (Abb. 1). In früheren Entwicklungsstadien erkennt man Stärkekörner auch innerhalb der Plastiden (Abb. 4). Brondy und Vatter (1959) beobachteten keine Stärkekörner innerhalb der Plastiden von *Porphyridium cruentum* und sahen darin ein allgemeines Merkmal der Rhodophyceen, im Unterschied zu den Chlorophyceen. Dieselben Autoren auf Grund ihrer Untersuchungen meinen, daß die Stärkekörner von *Porphyridium cruentum* stets von einer Membran umgeben sind. Die Ergebnisse aus dem von mir untersuchten Material stimmen mit jenen von Brondy und Vatter nicht überein, da die Stärkekörner nur ausnahmsweise von einer Membran umgeben sind.

### Zusammenfassung

Die Plastiden von 6 *Florideen*-Arten sind elektronenmikroskopisch auf ihren Feinbau untersucht worden. Sie zeigen, ohne Ausnahme, die auch für andere Algen bekannte Lamellen-Struktur.

Im Gebiet des Pyrenoids von *Rhodochorton floridulum* sind nur spärliche Lamellen zu erkennen.

Bei *Gigartina Teedii* sind überdies verschiedene Plastiden-Teilungsmodi und verschiedene Stadien des Teilungsprozesses abgebildet worden.

Die elektronenmikroskopischen Bilder sind im Institut für Allgemeine Botanik der E. T. H. Zürich gemacht worden. Dem verehrten Direktor des Instituts, Herrn Prof. Dr. A. Frey-Wyssling bin ich zu großem Dank für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und wertvolle Hilfe bei der Deutung der Bilder verpflichtet sowie Herrn Prof. Dr. K. Mühlethaler für die Einführung in die Elektronenmikroskopie. Ich danke auch dem Direktor des Botanischen Instituts der Universität Thessaloniki, Prof. Dr. Th. Dianelidis, für die Anregung zur Algen-Forschung und für kritische Bemerkungen während der Abfassung der vorliegenden Arbeit.

### Literatur

- Albertsson, P. A., and H. Leyon, 1954: The Structure of Chloroplast. V. *Chlorella pyrenoidosa* Pringsheim studied by means of electron microscopy. Exper. Cell Res. 7, 288.  
Biebl, R., 1956: Untersuchungen an Rotalgen-Plastiden. Protoplasma 26, 386.  
— 1959: Das Bild des Zelltodes bei verschiedenen Meeresalgen. Protoplasma 50, 321.

- Brondy, M., and A. Vatter, 1959: Observation on cellular Structures of *Porphyridium cruentum*. J. Biophysic. Biochem. Cytol. 5, 289.
- Drew, K. M., 1951: Rhodophyta, in Manual of Phycology, edited by Smith. Mass., USA.
- Harder, R., and W. Koch, 1949: Life history of *Bonnemaisonia hamifera* (Trailiella intricata). Nature 163, 106.
- Höfler, K., 1956: Über Plastiden und Blaszellen der Rotalgen. Pubbl. Staz. Zool. Napoli 28, 225.
- Humphrey, H. B., 1901: Observation on *Gigartina exasperata* Harv. Minnesota Bot. Stud., Ser. 2, Minneapolis.
- Kylin, H., 1930: Über die Entwicklungsgeschichte der Florideen. Lunds Univ. Arsskr. N. F. Avd 2, 26, Nr. 6.
- 1937: Anatomie der Rhodophyceen. Handb. d. Pflanzenanatomie. Hersg. von K. Linsbauer, 6, 2. Teilb., Berlin.
- 1954: Die Gattungen der Rhodophyceen. Lund.
- Leyon, H., 1954: The structure of Chloroplast. III. A Study of Pyrenoids. Exper. Cell Res. 6, 497.
- und D. v. Wettstein, 1954: Der Chromatophoren-Feinbau bei den Phaeophyceen. Z. Naturforsch. 9b, 471.
- Liebaldt, E., 1913: Über die Wirkung wäßriger Lösungen oberflächenaktiver Substanzen auf Chlorophyllkörner. Z. Bot. 5, 65.
- Mühlethaler, K., 1958: Submikroskopische Morphologie. Fshr. Bot. 21, 46.
- Myers, A., R. D. Preston, and G. W. Ripley, 1956: Finestructure in the red algae. I. X-ray and electron-microscopic investigation of *Griffithsia flosculosa*. Proc. Roy. Soc. London B. 144, 450.
- Olson, M. E., 1899: Observations on *Gigartina*. Minnesota Bot. Stud. Ser. 2, Minneapolis.
- Sager, G., and G. E. Palade, 1957: Structure and development of the Chloroplast in *Chlamydomonas*. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. 3, 463.
- Sjöstedt, L., 1926: Floridean Studies. Lunds Univ. Arsskr. N. F., Avd 2, 22, Lund.
- Steinmann, E., 1952: An electron microscope study of lamellar structure of Chloroplast. Exper. Cell Res. 3, 367.
- Wettstein, D., 1954: Formwechseln und Teilung der Chromatophoren von *Fucus vesiculosus*. Z. Naturforsch. 9b, 476.
- Wolken, J. J., and G. E. Palade, 1953: An electron microscope study of two flagellates. Chloroplast structur and variation. Ann. New York Acad. Sci. 56, 873.
- Zettrqvist, H., 1956: The ultrastructural organisation of the columnar absorbing cells of the Mouse Jejunum. Diss. Stockholm.

# Plastiden- und Stärke-Fluorochromierung mit Uranin

Von

Annemarie Ziegler

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. Februar 1960)

## A. Einleitung

In einer ersten Uraninstudie (Höfler, Ziegler, Luhan 1956) wurde das Hauptaugenmerk auf das Verhalten des Protoplasmas bei Färbung mit Uranin gerichtet. Die Versuche erbrachten eine Reihe interessanter Ergebnisse. So wurde die Beobachtung Dörings (1935) bestätigt und für allgemein verbreitet nachgewiesen, daß nur lebendes Plasma mit Uranin zu leuchtender Grünfluoreszenz gebracht werden kann; beim Absterben erlischt diese Fluoreszenz. Manchmal tritt allerdings auch an getötetem Plasma noch eine matt gelbgrüne Fluoreszenz auf, die jedoch mit dem strahlend bläulichgrünen Leuchten des lebenden Plasmas nicht zu verwechseln ist<sup>1</sup>. Gequollenes Plasma zeigte ganz allgemein verstärkte Uraninspeicherung. Weiter ergab sich, daß die von Strugger (1938) an *Allium cepa* beobachtete Erhöhung der Plasmaviskosität nicht überall auftritt. Auch die von Döring beschriebene Umlagerung wurde an zahlreichen Objekten wiedergefunden. Bei dieser Umlagerung wird das Uranin nach einiger Zeit vom Plasma nach dem Zellsaft verlagert, und zwar nicht das Uranin als solches; es wird vermutlich an Stoffwechselprodukte, die bei der Atmung entstehen, festgelegt (vgl. Drawert 1941) und in gebundenem Zustand vom Plasma nach der Vakuole abgegeben. Mit Plasma-Fluorochromierung und vor allem mit dem Phänomen der Umlagerung befaßt sich eine jüngst erschienene Arbeit von Enöckl (1960).

Die Mechanik der Uraninbindung selbst konnte bisher nicht geklärt werden. Daß es aber nicht einfache Elektroadsorption sein kann, wie Strugger (1938) annahm, geht unter anderem aus der Beobachtung hervor, daß auch salzgequollenes Plasma färbbar, ja sogar verstärkt färbbar

<sup>1</sup> Während der Drucklegung erschien eine Arbeit Drawerts (1960), über seine Fluorescein-Fluorochromierungsstudien an lebenden und toten Pflanzenzellen.



ist. Wenn es sich bei der Uraninbindung aber um eine einfache Ionenadsorption handelte, müßten ja die Salzionen im gequollenen Plasma die Farbanionen verdrängen und damit auch die Färbung blockieren.

Mehr am Rande beobachtet wurde von uns an den einzelnen untersuchten Pflanzen auch das Verhalten der Plastiden und der Stärkekörner nach Uraninfärbung. Die Tatsache, daß sich Stärkekörner in Plastiden durch Fluoreszeine zu lebhafter Fluoreszenz bringen lassen, war längst bekannt (Schumacher 1933, Döring 1935, Haitinger 1938, Eschrich 1953). Auch wir beobachteten an vereinzelt Schnitten derartige Stärkefärbungen.

Interessant erschien uns aber vor allem das anscheinend unterschiedliche Verhalten der lebenden Plastiden. So blieben die Chloroplasten im Uraninfarbbad meist ungefärbt und erschienen im UV-Licht in ihrer roten Eigenfluoreszenz, während z.B. die Leukoplasten der Orchidee *Platanthera bifolia* nach Uraninbehandlung grün fluorochromiert waren. In vereinzelt Fällen schienen aber auch die Chloroplasten mit Uranin färbbar zu sein; und zwar waren in den Schnitten oft nur die Chloroplasten der Schließzellen grün fluorochromiert, die Chloroplasten in den übrigen Zellen des Schnittes aber blieben ungefärbt. Es schien uns nun denkbar, diese Beobachtung mit der besonderen Funktion der Schließzellen als „enzymatische Spezialisten“ (Weber 1923) in Zusammenhang zu bringen, doch konnten wir in der Abhandlung, die sich ja vor allem mit dem Verhalten des Protoplasmas beschäftigte, nicht näher darauf eingehen. Das blieb weiteren ausführlichen Untersuchungen vorbehalten, die im folgenden beschrieben werden. Die Ergebnisse, die diese Untersuchungen zeitigten, wiesen allerdings in eine andere Richtung als unsere ersten Vermutungen.

### B. Fluorochromierungen mit Uranin

Da Fluoreszein selbst wenig wasserlöslich ist, wurden die Versuche, ebenso wie die der vorangegangenen Arbeit, mit dem gut wasserlöslichen Na-Fluoreszein, dem Uranin des Handels, ausgeführt. Zur Verwendung kamen stets saure gepufferte Lösungen, da ja das Uranin als saurer Farbstoff aus solchen besser vom lebenden Protoplasten aufgenommen wird. Am besten eignete sich die pH-Stufe um 4,8, die einfach mit  $m/150 \text{ KH}_2\text{PO}_4$  hergestellt wird. Da aber das gelöste Na-Fluoreszein die Reaktion der Pufferlösungen nach der alkalischen Seite hin verschiebt (siehe Höfler, Ziegler, Luhan 1956, S. 324), so bedeutet die Angabe pH 4,8 nur: im Puffer vom Durchschnittswert pH 4,8 (d. h. in  $m/150 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ ) gelöst.

Bei allen angeführten Versuchen wurden, wenn nichts anderes vermerkt, die Schnitte zehn Minuten lang im Uranin-Farbbad 1 : 10.000 belassen, dann im gleichnamigen farblosen Puffer gut ausgewaschen und anschließend beobachtet. Es wurden nicht nur Vertreter aus den verschiedensten Familien der Blütenpflanzen, sondern auch einige Moose und Farne untersucht. Die Mehrzahl der untersuchten Pflanzen gehört den Monokotylen an, da diese ja häufig besonders große Chloroplasten mit deutlich sichtbaren Granen und vor allem auch Leukoplasten besitzen. Die Pflanzen werden im fol-

genden systematisch nach Gruppen und Familien, innerhalb der einzelnen Blütenpflanzen-Familien jedoch ohne Rücksicht auf die systematische Stellung in alphabetischer Reihenfolge angeführt.

### 1. Plastiden

Übersicht über die untersuchten Pflanzen:

<b>Bryophyta</b>	<b>Acanthaceae</b>
Calypogeia fissa	Sanchezia nobilis
Lophozia bicuspidata	<b>Asclepiadaceae</b>
Plagiochila asplenioides	Hoya carnosa
Marchantia polymorpha	<b>Monocotyledonae</b>
<b>Pteridophyta</b>	<b>Hydrocharitaceae</b>
Selaginella Martensii	Elodea densa
Pteris cretica	Vallisneria spiralis
Nephrolepis exaltata	<b>Liliaceae</b>
Blechnum brasiliense	Agapanthus umbellatus
Blechnum occidentale	Aspidistra elatior
Polypodium aureum	Chlorophytum comosum
Polypodium glaucum	Dracaena deremensis
Platycerium alicorne	Polygonatum verticillatum
<b>Dicotyledonae</b>	Urginea maritima
<b>Urticaceae</b>	<b>Amaryllidaceae</b>
Pellionia Daveauana	Clivia nobilis
<b>Saururaceae</b>	Eucharis grandiflora
Houttuynia cordata	Haemanthus Catharinae
<b>Cactaceae</b>	<b>Commelinaceae</b>
Epiphyllum truncatum	Rhoeo discolor
<b>Euphorbiaceae</b>	Setcreasea purpurea
Phyllanthus grandifolius	Tradescantia purpusi
<b>Begoniaceae</b>	Tradescantia virginica
Begonia rex	Tradescantia zebrina
<b>Rosaceae</b>	<b>Orchidaceae</b>
Rosa canina	Cephalanthera alba
<b>Papilionaceae</b>	Coelogyne cristata
Phaseolus multiflorus	Cypripedium insigne
<b>Malvaceae</b>	Dendrobium moschatum
Abutilon striatum	Epipactis latifolia
<b>Linaceae</b>	Haemaria discolor
Reinwardtia indica	Orchis morio
<b>Vitaceae</b>	Platanthera bifolia
Vitis Voyniana	Stanhoepa tigrina
<b>Scrophulariaceae</b>	<b>Araceae</b>
Lathraea squamaria	Philodendron fragrantissimum

**Bryophyta*****Calypogeia fissa***

In den gefärbten Blättchen fluoresziert das Plasma grün; auch die Zellkerne, die im Hellfeld nicht sichtbar waren, leuchten ziemlich intensiv grün. Die Plastiden fluoreszieren weiterhin rot. Die im Hellfeld unverändert erscheinenden Ölkörper sind im UV-Licht nicht sichtbar.

***Lophozia bicuspidata***

Die Blättchen bieten im UV-Licht ein ähnliches Bild wie die von *Calypogeia fissa*. Plasma und Kerne sind grün fluorochromiert. Die Chloroplasten leuchten rot, von den Ölkörpern ist im UV-Licht nichts zu sehen.

***Plagiochila asplenoides***

Plasma und Zellkerne erscheinen grün fluorochromiert. Um die dunkelrotleuchtenden Plastiden ist meist ein zarter grüner Saum zu sehen. Im Inneren der Chloroplasten gibt es Stärkesplitter, die besonders grellgrün leuchten. Vereinzelte Zellen haben stark gequollenes Plasma, das intensiv grün fluoresziert. Die im Hellfeld unverändert erscheinenden Ölkörper zeigen keinerlei Fluoreszenzfärbung, auch die in vielen Zellen vorhandenen stark lichtbrechenden Tröpfchen zeigen keinerlei Fluoreszenz. Zahlreiche Zellen des Blättchens haben bereits kurze Zeit nach dem Färben grüne Vakuolenfluoreszenz. In diesen Zellen ist keine Kern- und Plasmafluoreszenz mehr wahrzunehmen.

***Marchantia polymorpha***

Es wurden Flächenschnitte von der Thallusoberseite untersucht. In lebenden Epidermis- und Parenchymzellen sind Plasma und Zellkerne grün fluorochromiert. Die Chloroplasten leuchten rot und sind von einem zarten grünen Hof umgeben, der bei allen Plastiden ungefähr gleich breit erscheint. Wo mehrere Plastiden sich zu Ketten aneinanderreihen, ist der zarte grüne Hof um die einzelnen Chlorophyllkörner besonders deutlich zu sehen. Alle Plastiden der untersuchten Schnitte enthielten in ihrem Inneren mehr oder weniger autochthone Stärkekörnchen, die ebenfalls grün fluorochromiert waren, und zwar wesentlich stärker und greller als das Plasma und die Zellkerne. Diese Stärkefärbung trat aber nur in lebenden Zellen auf, in denen auch Plasma- und Kernfärbung zu sehen war. In toten Zellen gab es nichts Grünfluoreszierendes mehr, obwohl sich mit Hilfe der JKI-Reaktion dort ebensoviel Stärke nachweisen ließ wie in den Chloroplasten der lebenden Zellen. In vereinzelter, meist größeren Zellen trat unmittelbar nach der Färbung Vakuolenfluoreszenz auf. Plasma und Zellkern dieser Zellen erschienen nicht fluorochromiert. Die Zellen lebten und ließen sich mit 0,8 Traubenzucker plasmolysieren. Die Plasmolyseform ist hier, wie bei *Allium cepa*, konkav-eckig. Der Protoplast haftete mit zahlreichen Hechtschen Fäden, die ebenfalls grün leuchteten, an der Wand. Auch in diesen Zellen leuchtete die Stärke in den Chloroplasten grellgrün. Nach einigen Minuten gab es dann auch unter den kleinen Parenchymzellen mehrere, die grüne Zellsaftfluoreszenz zeigten, deren Plasma und Zellkern aber nicht mehr fluorochromiert waren.

Die Schnitte wurden anschließend an die Beobachtung 24 Stunden in einem Schälchen mit farbloser Pufferlösung belassen. Nach dieser Zeit fand sich im Schnitt nichts Grünes mehr.

### *Pteridophyta*

#### *Selaginella Martensii*

Untersucht wurden Flächenschnitte vom Stengel. Plasma und Zellkerne waren grün fluorochromiert, besonders stark leuchteten aber die Stärkesplitter in den einzelnen Chloroplasten. Die Verbindungsfäden zwischen den einzelnen Plastiden, die ja hier rosenkranzförmig aneinanderhängen, waren zart grün fluorochromiert. Der grüne Hof um die einzelnen Plastiden war hier nirgends deutlich zu sehen.

#### *Pteris cretica*

Untersucht wurden Blattstiel-Flächenschnitte und Schnitte von der Blattunterseite.

In den Epidermiszellen des Blattstieles waren Plasma und Zellkerne grün fluorochromiert. Die rot leuchtenden Plastiden erschienen grün gesäumt. Stärke war in den Plastiden nicht vorhanden. Anders verhielten sich die Plastiden der unter der Epidermis gelegenen Parenchymzellen. Beim ersten flüchtigen Anblick erschienen sie als Ganzes grün leuchtend. Bei näherem Zusehen zeigte es sich aber, daß sie mit Stärke vollgefüllt waren, die intensiv grün leuchtete und so eine grüne Plastidenfluoreszenz vortäuschte; zwischen den einzelnen großen Stärkekörnern sah man die Plastiden mattrot durchschimmern. In toten Zellen, deren Plastiden ebenfalls von Stärke erfüllt waren, trat keine Stärkefärbung auf.

Auch in den Epidermiszellen der Blattunterseite gab es Plasma- und Zellkernfärbung. Die Plastiden waren wie die der Blattstielepidermis völlig frei von Stärke und fluoreszierten rot. In den Schließzellen schienen die Plastiden als Ganzes grellgrün zu leuchten. Sie waren vollgefüllt mit Stärke. Bei stark vergrößernder Optik sah man auch hier wieder dunkle Streifen zwischen den einzelnen grellgrün fluorochromierten Stärkekörnern. In vereinzelter Schließzellen von weit geöffneten Spaltöffnungen gab es nur wenige Stärkesplitterchen in den einzelnen Chloroplasten; auch sie leuchteten grellgrün, während die Chloroplasten rot fluoreszierten.

In toten Zellen war nirgends Stärkefluoreszenz zu sehen. Ein Schnitt wurde für 5 Stunden in einem Schälchen mit farbloser Pufferlösung belassen. Nach dieser Zeit hatte ein Teil der Zellen umgelagert, in den übrigen gab es noch immer Kern-, Plasma- und Stärkefärbung.

Durch ein Präparat wurde nach dem Färben  $n/1$  KOH durchgesaugt. Nach dem Zutritt der Lösung zum Schnitt gab es keine Grünfluoreszenz mehr, auch die Assimilationsstärke in den Plastiden war nicht mehr fluorochromiert. Die Plastiden selbst leuchteten ganz matt graurot.

#### *Nephrolepis exaltata*

In den Zellen der Blattunterseite trat grüne Plasma- und Kernfluoreszenz auf. Die rotleuchtenden Plastiden waren von einem zarten grünen Saum umgeben, die autodithone Stärke in ihrem Inneren fluoreszierte grellgrün. In vereinzelter Zellen gab es neben den Chloroplasten noch kleinere farblose Kügelchen (Leukoplasten?), die mattgrün fluorochromiert waren und sich mit Jod braun färbten.

*Blechnum brasiliense*

Untersucht wurden Schnitte von der Blattunterseite. In den Epidermiszellen waren Plasma und Zellkern grün fluorochromiert, wobei besonders die Zellkerne stark leuchteten. Die Plastiden erschienen im UV-Licht mattrot und waren von einem zarten grünen Saum umgeben; sie waren vollkommen stärkefrei. Anders sahen die Plastiden der Schließzellen aus. Auch hier leuchteten Plasma und Zellkern grün, besonders grellgrün aber leuchteten die Chloroplasten, die ganz erfüllt von Stärke waren und so eine Plastidenfärbung vortäuschten. Zwischen den einzelnen großen Stärkekörnern schimmerte dunkel mattrot die Plastidensubstanz durch (Abb. 1).

In den subepidermal gelegenen Parenchymzellen trat ebenfalls Plasma- und Kernfärbung auf. Die rot leuchtenden Plastiden waren von einem zarten grünen Hof umgeben, in ihrem Inneren waren die Splitter von autochthoner Stärke grellgrün fluorochromiert.

Nach 24 Stunden Verweilen der Schnitte in farbloser Pufferlösung hatten die Epidermiszellen umgelagert. Die sonst durch Eigenfluoreszenz blau leuchtenden Zellsäfte erschienen nun blaugrün bis grün. Von Plasmafärbung war nichts mehr zu sehen. Unter den Plastiden gab es jetzt auffallend viele Teilungsformen. In den Schließzellen war nichts Grünes mehr zu sehen; hier hatte keine Umlagerung stattgefunden.

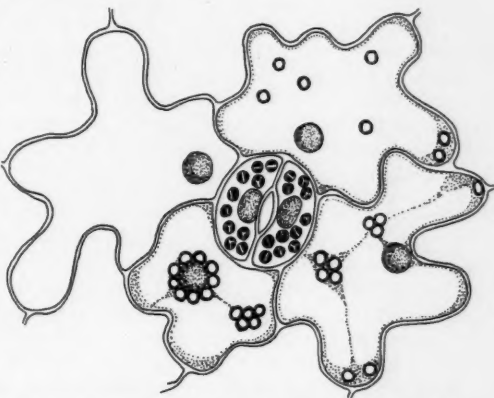


Abb. 1. *Blechnum brasiliense*, Blattunterseite. Plasma und Zellkerne sind grün fluorochromiert. Die rot fluoreszierenden Chloroplasten sind von einem zarten grünen Saum umgeben. Die stärkereichen Plastiden der Schließzellen scheinen als Ganzes grün zu leuchten.

*Blechnum occidentale*

Die Epidermiszellen der Blattunterseite zeigten Plasma- und Kernfärbung. Die rot leuchtenden Chloroplasten waren zartgrün gesäumt. Hier gab es auch in den Plastiden der Epidermiszellen kleine Stärkesplitter, die grellgrün fluorochromiert waren. Die Chloroplasten der Schließzellen waren wieder angefüllt mit Stärke, die ebenfalls grellgrün leuchtete. Das Bild kann bei flüchtiger Beobachtung und Verwendung einer schwächeren UV-Lampe sehr leicht Chloroplastenfärbung vortäuschen.

*Polypodium aureum*

In den Epidermiszellen der Blattunterseite waren Plasma und Zellkerne grün fluorochromiert. Die Chloroplasten erschienen rot mit zartem grünem Saum. Die

Assimilationsstärke in diesen Chloroplasten leuchtete grellgrün. In den Schließzellen war hier noch keinerlei Färbung zu sehen, auch keine Stärkefärbung, obwohl die Jodprobe reichlich Stärke in den Chloroplasten nachwies. Anscheinend war hier nach einer Färbezeit von 10 Minuten noch kein Farbstoff eingedrungen.

Nach 24 Stunden Verweilen in farbloser Pufferflüssigkeit hatten einige Epidermiszellen den Farbstoff vom Plasma zur Vakuole umgelagert, die Mehrzahl der Zellen zeigte jedoch nur mehr die mattblaue Eigenfluoreszenz des Zellsaftes.

#### *Polypodium glaucum*

Die Epidermiszellen der Blattunterseite zeigten Kern- und Plasmafärbung. Die rot leuchtenden Plastiden hatten einen zarten grünen Saum, zeigten aber keinerlei Stärkefärbung, während in den Chloroplasten der Schließzellen große, intensiv grün fluorochromierte Stärkekörner lagen. Beim Nachprüfen mit JKJ zeigte sich, daß die Plastiden der Epidermiszellen völlig stärkefrei waren.

Nach 24 Stunden Verweilen der Schnitte in farbloser Pufferlösung gab es keine Plasma-, Kern- und Stärkefärbung mehr. Die Epidermiszellen hatten umgelagert, ihre Vakuolen fluoreszierten mattgrün, während die Vakuolen der Parenchymzellen nur ihre blaue Eigenfluoreszenz aufwiesen. Auch in den Schließzellen hatte keine Umlagerung stattgefunden.

#### *Platyserium alicorne*

In den Epidermiszellen der Blattunterseite wie auch in den subepidermal gelegenen Parenchymzellen waren Plasma und Zellkerne grün fluorochromiert. In den rot fluoreszierenden, von einem zarten grünen Saum umgebenen Chloroplasten leuchtete die autochthone Stärke grellgrün auf. Auch hier war, wie bereits für *Polypodium* erwähnt, in den lebenden Schließzellen nach einer Färbedauer von 10 Minuten noch keinerlei Fluorochromierung des Zellinhaltes zu sehen.

Nach 48 Stunden Aufenthalt des Schnittes in farblosem Puffer hatten die Epidermiszellen den Farbstoff umgelagert. Sie hatten mattgrün leuchtende Vakuolen. Von Stärkefärbung war nichts mehr zu sehen.

### Dicotyledonae

#### Urticaceae

#### *Pellionia Daveauana*

Untersucht wurden Quer- und Längsschnitte durch den Stengel. In den Parenchymzellen leuchteten Plasma und Zellkerne grün. Die Chloroplasten fluoreszierten rot und hatten einen schmalen grünen Hof. Die autochthone Stärke in den Chloroplasten leuchtete grellgrün. Besonders schön waren die Stärkekörner gefärbt, denen die Reste des Chloroplasten noch seitlich ansitzen. Das Stärkekorn war leuchtend grün, der Plastidenrest rot mit grünem Saum. Im Mark gibt es große Stärkekörner, an denen keine Plastidenreste mehr zu sehen sind. Sie leuchteten grell grün. Auch die aus dem Schnitt herausgefallenen und in der Pufferlösung unter dem Deckglas liegenden Stärkekörner waren grün fluorochromiert.

Aus einem Schnitt, durch den n/1 KOH gesaugt wurde, verschwand jegliche Grünfluoreszenz. Von Stärkefärbung war nichts mehr zu sehen. Auch die Rotfluoreszenz der Plastiden schwand fast gänzlich.

Durch einen zweiten Schnitt wurde n/10 HCl durchgesaugt. Auch hier verschwindet jegliche Grünfluoreszenz, die Rotfluoreszenz der Chloroplasten



aber bleibt bestehen, ja sie erscheint sogar noch verstärkt. Vereinzelte Stärkekörner sehen zunächst noch matt blaugrün aus, aber auch sie verlieren ihre Farbe sehr bald.

#### Saururaceae

##### *Houttuynia cordata*

Untersucht wurden Flächen- und Querschnitte vom Blattstiel. In den Parenchymzellen waren die Kerne grün fluorochromiert. Auch der Plasmawandbelag und die Plasmasepten, die die Zelle durchziehen, leuchteten grün. Am kräftigsten leuchtete aber auch hier wieder die autochthone Stärke in den rotfluoreszierenden Chloroplasten. Um die einzelnen Plastiden war der zarte grüne Saum deutlich zu sehen. Die Zellen des Stengelmarkes waren ganz erfüllt von großen Stärkekörnern, die ebenfalls grellgrün fluorochromiert waren. Allerdings wieder nur in lebenden Zellen. Doch waren auch die Stärkekörner, die außerhalb des Schnittes lagen und aus angeschnittenen Zellen stammten, grün fluorochromiert.

Bei Zusatz von  $n/1$  KOH zu einem Schnitt starben die Zellen ab. Im Augenblick des Absterbens verschwand die Plasma- und Kernfärbung aber auch die Stärkefärbung in den Chloroplasten.

Die Plasmafluorochromierung mit Uranin zeigte eine gewisse pH-Abhängigkeit, wobei aber keine scharfe Farbeschwelle auftrat, wie dies sonst bei Elektroadsorptivfärbung des Plasmas oder des Zellkernes mit basischen Fluorochromen der Fall ist (Strugger 1938, Höfler, Ziegler, Luhan 1956). Die Fluorochromierung des Plasmas war bei unseren Versuchen am kräftigsten bei pH 4,8, wurde bei pH 7–8 schwächer und war bei pH 10 minimal. Um nun auch etwaige Farbeschwellen für die Plastiden- und Stärkefärbung feststellen zu können, wurden an verschiedenen Pflanzen pH-Reihenversuche angestellt, deren Ergebnisse zusammenfassend im Schlußkapitel besprochen werden. Auch Stengelschnitte von *Houttuynia* wurden in pH-gestuften Farbbädern fluorochromiert.

pH 4,8: Plasma und Zellkerne sind kräftig grün fluorochromiert. Um die rotleuchtenden Chloroplasten findet sich ein zarter grüner Hof. Die Assimilationsstärke in den Chloroplasten leuchtet grellgrün.

pH 6,0: Auch hier gibt es noch intensive Plasma-, Kern- und Stärkefärbung. Der grüne Saum um die rotleuchtenden Chloroplasten ist ebenfalls deutlich zu sehen.

pH 7,1: Plasma-, Kern- und Stärkefärbung ist wohl noch deutlich zu sehen, ist aber bereits viel schwächer als bei pH 6,0.

pH 8,0: In vereinzelt Randzellen des Schnittes findet sich noch Plasma-, Kern- und Stärkefärbung. Daneben gibt es in vereinzelt Zellen auch grüne Vakuolenfluoreszenz.

pH 8,75: Hier gibt es in den Rindenzellen keinerlei Grünfluoreszenz von Plasma, Kern oder Stärke. Auch zeigen die rotleuchtenden Plastiden keinerlei grünen Saum. Vereinzelt Zellen haben leuchtend grüne Vakuolen. In allen Zellen gibt es lebhaft Plasmaströmung. In sehr vielen Zellen des Markes war allerdings die Reservestärke noch leuchtend grün fluorochromiert, von Plasma- und Kernfärbung war aber auch in diesen Zellen nichts mehr zu sehen.

pH 10,1: Die Zellen leben und zeigen lebhaft Plasmaströmung. Im ganzen Schnitt gibt es aber keine Spur von Grünfärbung mehr.

Bei einer zweiten Versuchsreihe, die 5 Tage später am gleichen Pflanzenmaterial mit denselben Pufferlösungen angestellt wurde, zeigten sich zunächst ganz andere

Ergebnisse. Hier waren bei pH 8,75 Plasma und Zellkerne noch immer lebhaft grün fluorochromiert. Selbst bei pH 10,1 gab es noch immer schwache Plasma- und Kernfärbung, auch der grüne Saum um die Chloroplasten war noch zu sehen. Die Stärkekörner waren noch ziemlich kräftig fluorochromiert. Diese unerwarteten Färbegergebnisse ließen sich aber bald aufklären. Beim Nachmessen der gepufferten Lösungen zeigte sich, daß die alkalischen Werte sehr stark nach der sauren Seite hin verschoben waren, obwohl die Lösungen in gut schließenden Fläschchen mit eingeschliffenem Glasstöpsel aufbewahrt wurden. So zeigte die Lösung, die ursprünglich einen pH-Wert um 10,1 hatte, jetzt nur mehr ein pH von 8,54. Bei pH-Angaben von nicht unmittelbar für den betreffenden Versuch bereiteten Pufferlösungen ist daher immer Vorsicht geboten.

#### Cactaceae

##### *Epiphyllum truncatum*

Die Epidermiszellen der Blattunterseite zeigten Plasma- und Kernfärbung. Die Plastiden in den Schließzellen sahen grün fluorochromiert aus. Sie enthielten derart viel Stärke, daß von dem mattrot fluoreszierenden Chlorophyllkorn nur ganz schmale Streifen zwischen den grellgrün leuchtenden Stärkekörnern zu sehen waren.

#### Euphorbiaceae

##### *Phyllanthus grandifolius*

In den Epidermiszellen der Blattunterseite sind Plasma und Kerne grün fluorochromiert. Auch die Leukoplasten leuchten grün. In den subepidermal gelegenen Parenchymzellen ist ebenfalls Kern- und Plasmafärbung zu sehen. Die rot fluoreszierenden Chloroplasten sind von einem schmalen grünen Saum umgeben. Den meisten Plastiden sitzt seitlich eine Stärkekappe an, die intensiv grün leuchtet.

#### Begoniaceae

##### *Begonia rex*

Untersucht wurden Querschnitte durch den Blattstiel. In den Parenchymzellen waren Plasma und Zellkern grün fluorochromiert; im Plasma gab es zahlreiche kleine Kügelchen, die besonders intensiv grün leuchteten. Die Chloroplasten fluoreszierten rot und waren von einem schmalen grünen Hof umgeben. Die autochthone Stärke in den Chloroplasten der lebenden Zellen leuchtete intensiv grün. In toten Zellen war nichts von Grünfluoreszenz zu sehen, obwohl dort die Plastiden gleichviel Stärke enthielten wie in den lebenden Zellen.

#### Rosaceae

##### *Rosa canina*

Untersucht wurden Zellen aus dem Fruchtfleisch der Beeren. Plasma und Zellkerne waren wie üblich grün fluorochromiert, die spindelförmigen Chromoplasten hingegen zeigten keinerlei Färbung mit Uranin.

#### Papilionaceae

##### *Phaseolus multiflorus*

Es wurden Stengel-Flächenschnitte sowie Schnitte von der Blattunterseite einer unter Lichtabschluß erzogenen, etiolierten Pflanze untersucht.

Im Stengelparenchym färbten sich hier neben Plasma und Zellkern auch die Proplastiden (Phasenkontrast!) grün an. Die Proplastiden fluoreszieren

aber nur mattgrün, bei weitem nicht so stark wie die Stärke in den Chloroplasten. Sie werden zeitweilig von der Plasmaströmung in der Zelle erfaßt und ein Stück weit mitgeschleppt; dabei wird amöboide Formveränderung sichtbar. Im grün fluorochromierten Plasma gab es auch hier wieder zahlreiche kleine Körnchen, die besonders intensiv grün leuchteten. Die Plastiden der Schließzellen waren voll von Stärke, die grellgrün aufleuchtete und so Plastidenfärbung vortäuschte.

In den kleinen zart gelblichen Blättchen waren die Mutterzellen der Schließzellen und ihre Weiterentwicklung schön zu beobachten. Die Schließzellenmutterzellen besitzen in der Mitte eine kleine Vakuole, die im UV-Licht dunkel erscheint. Sie sind ganz erfüllt von kräftig grün fluorochromiertem Plasma. Auch die beiden kleinen Schließzellen, die durch Teilung aus dieser Mutterzelle entstehen, sind zunächst ganz erfüllt vom kräftig grün fluorochromierten Plasma. Jede Schließzelle besitzt 1 oder 2 kleine Vakuolen, die im UV-Licht dunkel erscheinen. Von Stärke oder Plastidenfärbung ist in diesen ersten Stadien noch nichts zu sehen. Auch mit JKJ konnte in den Schließzellen noch keine Stärke nachgewiesen werden. In den größeren älteren Schließzellen, die auch noch fast zur Gänze von Plasma erfüllt sind und 1 bis 2 kleine Vakuolen beinhalten, enthalten die Plastiden bereits intensiv grün fluorochromierte Stärkekörner (vgl. Reuter 1956). In den Blattnervendekzellen gibt es farblose Plastiden, die sich mit Uranin grün fluorochromieren. Die übrigen Epidermis- und Parenchymzellen sind noch sehr klein und zeigen grüne Plasma- und Kernfluoreszenz.

#### Malvaceae

##### *Abutilon striatum*

Die Epidermiszellen und die darunterliegenden Parenchymzellen der Blattunterseite zeigen Kern- und Plasmafärbung. Die rot fluoreszierenden, von einem zarten grünen Hof umgebenen Chloroplasten der Parenchymzellen sind stärkefrei. In den Chloroplasten der Schließzellen gibt es hingegen große Stärkekörner, die intensiv grün leuchten.

#### Linaceae

##### *Reinwardtia indica*

Untersucht wurden die Blütenblätter. Sie sind dunkelgelb gefärbt und verdanken diese Färbung schönen großen Chromoplasten, die in normalen lebenden Zellen ein ähnliches Mosaik bilden wie die Chloroplasten der Moosblättchen (Abb. 2 a). Nach Uraninfärbung fluoreszieren Plasma und Zellkerne leuchtend grün, die Chromoplasten sind nicht gefärbt. Anders verhalten sich die Chromoplasten in den nicht mehr vollturgesczten Partien der Blütenblätter, deren Zellen zwar noch leben, aber doch bereits Veränderungen gegenüber den normalen lebenden Zellen aufweisen. Am auffälligsten verändert erscheinen die Chromoplasten. Sie sind vakuolig degeneriert (Küster 1937, Zurzycki 1954, Abb. 8). Einer farblosen 5–6  $\mu$  großen Blase sitzt einseitig eine dunkelgelbe Kappe auf (Abb. 2 b). Das Bild erinnert an die von Biehl (1940, Abb. 4) beschriebene vakuolige Degeneration der Chloroplasten von *Hookeria lucens*. Im UV-

Licht erscheint die Blase dunkel, die Kappe fluoresziert kaum merklich braungelb. Anders nach Uraninfärbung; jetzt leuchtet die Blase ziemlich kräftig grün, von der Kappe ist kaum mehr etwas zu sehen. Die Schnitte boten im UV-Licht meist einen eigenartigen Anblick (Abb. 2 b): Die vakuolig degenerierten Plastiden lagen nämlich meist in Doppelreihen in den durch die Membranleisten gebildeten „Fächern“ der Zelle, so daß auf dunklem Untergrund zahlreiche parallel liegende, aus einzelnen grünen Punkten zusammengesetzte Streifen zu sehen waren. Die gleiche vakuolige Degeneration ließ sich durch einfaches Auflegen der Blütenblätter auf Wasser her-

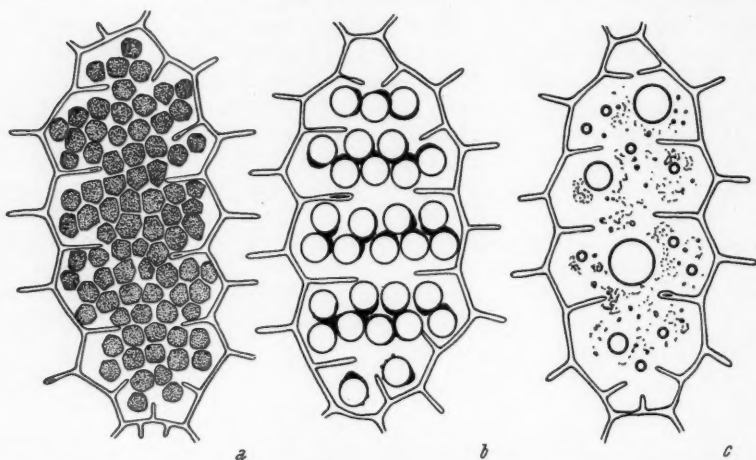


Abb. 2. *Reinhardtia indica*, Blütenblattepidermis. a Zelle mit normalen Chromoplasten; b Zelle, deren Chromoplasten vakuolig degeneriert sind; c tote Zelle mit großen gelben Öltropfen.

beiführen. Schon Schimper (1883) waren ja die „hohlen Kugeln“ bekannt, zu denen die Chromoplasten von *Tulipa* beim Berühren mit Wasser aufquellen. Dieser Vorgang kann durch Einbringen in hypertonsche Lösung wieder rückgängig gemacht werden.

In den völlig degenerierten Zellen, in denen nur mehr Reste vom koaguierten Plasma und gelbe große Fetttropfen lagen (Abb. 2 c), färbte sich mit Uranin nichts mehr an.

#### Vitaceae

##### *Vitis Voineriana*

Untersucht wurden Quer- und Längsschnitte vom Stengel und Schnitte von der Blattunterseite.

In den Epidermis- und Parenchymzellen des Stengels trat grüne Kern- und Plasmafärbung auf. Um die Chloroplasten war ein zarter grüner Hof zu sehen. Die autochthone Stärke in den Plastiden leuchtete besonders intensiv grün. In den weiter nach innen gelegenen Zellen gab es große Stärke-

körner, denen noch Reste des Chloroplasten seitlich ansaßen. Diese Stärkekörner leuchteten ebenfalls kräftig grün, die ansitzenden Chloroplastenreste waren rot und schienen von einem zarten grünen Saum umgeben. In den Markzellen des Stengels lagen große, leuchtend grün fluorochromierte Stärkekörner, an denen keine Plastidenreste mehr zu sehen waren.

Viele Zellen des Stengels zeigten neben Kern-, Plasma- und Stärkefärbung auch bereits Grünfluoreszenz der Vakuole. In toten Zellen war keinerlei Färbung der Stärke zu sehen.

Nach 24 Stunden Verweilen der Schnitte in der Pufferlösung waren viele Zellen dicken Schnitten noch immer Stärkefärbung zu sehen, und zwar war sowohl die Assimilationsstärke in den Plastiden als auch die Reservestärke im Mark gefärbt. In einem dünnen Schnitt war dagegen vollkommene Umlagerung eingetreten, die Stärke war jetzt völlig fluoreszenzfrei.

Auch in den Parenchymzellen des Blattes trat Kern- und Plasmafärbung auf. Die rot fluoreszierenden Chloroplasten waren von einem zarten grünen Hof umgeben, die autochthone Stärke leuchtete intensiv grün.

Nach 24 Stunden Verweilen der Schnitte in der Pufferlösung waren viele Zellen des Schnittes abgestorben, die noch lebenden hatten vollkommen umgelagert.

Stengellängsschnitte wurden in einer pH-gestuftten Farbbadreihe gefärbt:

pH 2,04: Die überwiegende Mehrzahl der Zellen ist tot. In allen lebenden Zellen ist die Vakuole grün fluorochromiert. Plasma, Zellkern und Stärke leuchten ebenfalls grün. Die Plastiden erscheinen rot.

pH 4,8: Hier leben alle Zellen. Sie haben schöne Plasma-, Kern- und Stärkefärbung. In vielen Zellen sind die Zellsäfte ebenfalls grün fluorochromiert.

pH 6,0: Schöne Plasma-, Kern- und Stärkefärbung. Das Plasma scheint besonders an den Schmalseiten der Zellen stark fluorochromiert, was dem Schnitt im UV-Licht ein eigenartiges Aussehen verleiht.

pH 8,0: Hier ist im Schnitt nichts Grünes mehr zu sehen.

pH 10,1: Gleiches Bild wie pH 8,0.

Durch einen bei pH 4,8 gefärbten Schnitt wurde  $n/1$  HCl durchgesaugt. Nach einigen Minuten verschwand die Grünfluoreszenz der Stärke, die Chloroplasten leuchteten weiterhin rot, und zwar intensiver als vorher, hatten aber keinen grünen Saum mehr.

## Scrophulariaceae

### *Lathraea squamaria*

Untersucht wurden Schnitte von der Unterseite der Schuppenblätter. In den Epidermiszellen trat schöne Plasma- und Kernfärbung ein. Die im Hellfeld farblos erscheinenden Plastiden schienen hier besonders grell zu leuchten. Bei näherem Zusehen zeigte sich aber, daß die grellgrün leuchtende Kugel nur ein Teil des Plastiden war. In jedem der Plastiden, die nur kaum merklich grün fluorochromiert waren, saß seitlich ein kleines, grellgrün leuchtendes Kügelchen, das sich mit Jod schwarzblau färbte und sich so als Stärke zu erkennen gab.

## Acanthaceae

### *Sanchezia nobilis*

In den Epidermiszellen der Blattunterseite waren Plasma und Zellkern gefärbt. Die hier spärlich vorhandenen Leukoplasten leuchteten ebenfalls grün. In den Schließzellen war neben Plasma und Zellkern vor allem die Stärke

in den Chloroplasten kräftig fluorochromiert. In den subepidermal gelegenen Parenchymzellen, in denen ebenfalls Kern und Plasma grün leuchteten, gab es um die rot fluoreszierenden Chloroplasten wieder einen zarten grünen Saum. Die Assimilationsstärke im Innern der Chloroplasten war grellgrün fluorochromiert. Unter der starken UV-Lampe starben die Zellen des Schnittes nach 10 bis 15 Minuten ab. In den toten Zellen war dann keinerlei Grünfluoreszenz mehr zu sehen.

#### Asclepiadaceae

##### *Hoya carnosa*

Untersucht wurden Längsschnitte durch den Blattstiel und Schnitte von der Blattunterseite.

Die Parenchymzellen im Blattstiel hatten Plasma und Kern grün fluorochromiert. Die rot leuchtenden Chloroplasten waren von einem zarten grünen Saum umgeben. Die meisten von ihnen beinhalten zahlreiche kleine Stärkesplitter, die intensiv grün leuchteten.

Die Epidermiszellen der Blattunterseite, die ebenfalls Plasma- und Kernfärbung zeigten, enthielten Chloroplasten, die mattrot fluoreszierten. Die Chloroplasten der darunterliegenden Parenchymzellen enthielten große, intensiv grün fluorochromierte Stärkekörner.

#### Monocotyledonae

##### Hydrocharitaceae

##### *Elodea densa*

In den Blättchen, die 10 Minuten lang im Farbbad gelegen waren, war besonders in den Zellen der Mittelrippe und des Blattgrundes lebhaft Plasmaströmung zu beobachten. Plasma und Zellkerne waren grün fluorochromiert; besonders stark leuchtete das gequollene Plasma vereinzelter Zellen der Blattbasis. Die rot fluoreszierenden Chloroplasten waren grün gesäumt. An den vom strömenden Plasma mitgeschleppten Plastiden war hier sehr schön zu sehen, daß dieser grüne Saum nicht etwa das umgebende Plasma darstellt, in das die Plastiden eingebettet sind, sondern daß es sich dabei wirklich um etwas den Plastiden selbst Zugehörendes handelt. In den roten Chloroplasten gab es auch hier wieder intensiv grün leuchtende Stärkesplitter. Die Verteilung der Stärke im Blatt wurde hier mit Hilfe des Uransins besonders deutlich sichtbar gemacht. Besonders stärkereich waren die Zellen der Mittelrippe sowie die Zellen der Blattbasis. Von hier nahm der Stärkegehalt gegen die Blattspitze zu immer mehr ab. Die obere Hälfte der Blattspreite war stärkefrei (siehe M o d e r 1932). An den Zellsäften der in beiden Zellschichten des Blattes gelegenen Idioblasten, die blaue Eigenfluoreszenz zeigen, war nach dieser kurzen Färbedauer noch keine Veränderung wahrzunehmen.

Nach 3 Stunden Verweilen in der farblosen Pufferlösung zeigten die Zellen noch immer Kern-, Plasma- und Stärkefärbung; die Idioblasten fluoreszierten aber nicht mehr blau, sondern gelblichgrün bis grün. Die Plasmaströmung in den Zellen der Blattmittelrippe war noch immer lebhaft, in den Spreitenzellen schien sie jetzt langsamer.

An Blättchen, die 24 Stunden in einem Schälchen mit farbloser Pufferlösung gelegen waren, gab es noch immer Plasmaströmung, die besonders



lebhaft in den Zellen der Mittelrippe war. An der Blattbasis war Strömung in den Spreitenzellen der Blattober- und -unterseite zu sehen. Von Grünfluoreszenz war im ganzen Blättchen nichts mehr zu sehen, auch die Idioblasten leuchteten wieder rein blau. Nur die Vakuolen der Blattzähnen leuchteten matt blaugrün.

In Blättchen, die 24 Stunden lang in feuchter Kammer unter Deckglas in einem Tropfen Pufferlösung gelegen waren, war nichts mehr von Plasmaströmung zu sehen. Die Vakuolen der Idioblasten, die durchwegs Vakuolenkontraktion zeigten, fluoreszierten hier noch grünblau, ihr Plasma war mattgrün. In 0,8 mol Traubenzucker trat in allen Zellen des Blättchens Plasmolyse ein, und zwar in den kleinen Zellen der Blattunterseite konkav, in den großen Zellen der Oberseite aber konvex.

Um nachzuprüfen, ob nicht eine längere Färbedauer doch auch zu einer Fluorochromierung der Chloroplasten führen könnte, wurden Blättchen 1, 3 und 24 Stunden bzw. 3 Tage lang im Farbbad belassen.

Die Zellen der Blättchen, die 1 Stunde lang im Uraninfarbbad lagen, zeigten nachher schöne Plasma- und Kernfärbung. Die Plastiden waren aber trotz längerer Farbeinwirkung rot und schienen von einem zarten grünen Saum umgeben. Die Assimilationsstärke in den Plastiden war intensiv grün fluorochromiert. Die Vakuolen der Idioblasten erschienen nach dieser längeren Färbezeit nicht mehr rein blau, sondern weißlich bis grünlichgelb. Auch hier war lebhaft Plasmaströmung, besonders in den Blattgrundzellen und in den Zellen der Mittelrippe, zu beobachten. Die Blättchen blieben anschließend für 24 Stunden in einer feuchten Kammer unter Deckglas liegen. Nach diesen 24 Stunden zeigten sie folgendes Bild: Plasma und Zellkerne waren nach wie vor grün fluorochromiert. Von Stärkefärbung war hier nichts mehr zu sehen, obwohl sich Stärke mit Hilfe der Jodprobe in den Chloroplasten nachweisen ließ. Die Idioblasten zeigten starke Vakuolenkontraktion. Die Vakuolen fluoreszierten gelbgrün, das Plasma rein grün.

Blättchen, die 3 Stunden lang im Farbbad gelegen hatten, wiesen ebenfalls schöne Plasma-, Kern- und Stärkefärbung auf. Die noch immer rot fluoreszierenden Chloroplasten waren grün gesäumt. Die Idioblasten hatten hier bereits rein grüne Zellsäfte. In den Zellen der Mittelrippe und in zahlreichen Spreitenzellen, besonders an der Blattbasis, war lebhaft Plasmaströmung zu sehen.

Auch Blättchen, die 24 Stunden lang im Farbbad lagen, zeigten nur Plasma-, Kern- und Stärkefärbung. Die Chloroplasten fluoreszierten rot. Die Idioblasten zeigten starke Vakuolenkontraktion. Der Vakuoleninhalt fluoreszierte gleißend grün, das Plasma nur mattgrün. Plasmaströmung war auch in diesen Blättchen zu sehen, doch war sie nicht besonders lebhaft.

Blättchen, die 3 Tage lang im Uraninfarbbad lagen, zeigten Plasma-, Kern- und Stärkefärbung. Die Plastiden leuchteten rot und waren von einem grünen Saum umgeben. Die Vakuolen der Idioblasten waren stark kontrahiert und leuchteten gleißend grün. In zahlreichen Zellen der Blattspreite war träge Plasmaströmung zu beobachten.

Es war also hier trotz lange dauernder Färbezeit

(bis zu 3 Tagen) nirgends zur Anfärbung der Chloroplasten gekommen. Sie leuchteten ebenso wie nach kurzer Farbeinwirkung rot und waren von einem zarten grünen Saum umgeben.

#### *Vallisneria spiralis*

Untersucht wurden Flächenschnitte von der Blattunterseite. Auch hier wurden wieder verschieden lange Färbezeiten angewendet, und zwar  $\frac{1}{4}$  Stunde,  $\frac{1}{2}$  Stunde, 3 Stunden und 24 Stunden. Die Ergebnisse waren aber stets die gleichen. Plasma und Zellkerne waren grün fluorochromiert, die rot fluoreszierenden Chloroplasten schienen grün gesäumt. Die Stärkesplitter im Inneren der Plastiden leuchteten intensiv grün. Überall gab es schöne Plasmaströmung, die aber in den 24 Stunden lang gefärbten Schnitten viel langsamer war als in jenen, die nur  $\frac{1}{4}$  Stunde im Farbbad lagen.

15 Minuten lang gefärbte Schnitte, die anschließend 24 Stunden lang in einem Schälchen mit farbloser Pufferlösung lagen, zeigten keinerlei Grünfluoreszenz mehr. Die Plasmaströmung war noch immer unverändert lebhaft. Auch ein Schnitt, der gleich lang unter Deckglas in der feuchten Kammer lag, zeigte keinerlei Grünfluoreszenz mehr.

#### Liliaceae

##### *Agapanthus umbellatus*

Untersucht wurden junge Blättchen, die noch völlig farblos schienen, und solche, deren Basis noch farblos, deren Spitze aber bereits ergrünt war.

In den Epidermis- und Parenchymzellen der ca.  $1\frac{1}{2}$  cm langen farblosen Blättchen waren Plasma und Zellkern grün fluorochromiert. In der Epidermis lagen außerdem noch grün leuchtende Leukoplasten. In den Mesophyllzellen gab es ebenfalls zart grün fluorochromierte, mehr oder weniger kugelige Proplastiden, die im Hellfeld völlig farblos erschienen und nur schwer zu erkennen waren. Sie lagen in vielen Zellen an den beiden Zellpolen (siehe Strugger 1954, Abb. 2) gehäuft, in den übrigen Zellen unregelmäßig über die ganze Zelle verteilt. In den Schließzellen war die Plastidenstärke lebhaft grün fluorochromiert.

In einem älteren, ca. 5 cm langen Blättchen hatten die Epidermiszellen der farblosen Blattzone grün fluorochromiertes Plasma und Zellkerne. Auch die Leukoplasten fluoreszierten grün. Die Plastiden der Schließzellen waren im Hellfeld kaum merklich grün, aber ganz erfüllt von Stärke, die grellgrün fluoreszierte. In den Mesophyllzellen lagen unregelmäßig geformte Proplastiden, die mattgrün fluorochromiert waren und amöboide Formveränderung zeigten. In den Mesophyllzellen der bereits ergrünten Blattspitze war die Assimilationsstärke grün fluorochromiert, die Plastiden selbst leuchteten rot und zeigten einen zarten grünfluoreszierenden Saum.

##### *Aspidistra elatior*

Untersucht wurden oberflächennahe Längsschnitte vom Blattstiel und Schnitte von der Blattunterseite.

In den Zellen des Blattstieles waren Plasma und Zellkern grün fluorochromiert. Die grünesäumten Chloroplasten fluoreszierten rot. Die Grana

waren hier besonders deutlich zu sehen. Zwischen den rotleuchtenden Granen aber gab es nichts Grünes, das auf eine Fluorochromierung des Stromas hätte schließen lassen. Es war also auch hier bei den großen Chloroplasten keine Färbung des Stromas mit Uranin wahrnehmbar, sie mußte denn so gering gewesen sein, daß sie von der Rotfluoreszenz des Chlorophylls überstrahlt war. Manchmal schien zwar über den granafreien Teilen der Plastiden ein grüner Schimmer zu liegen, der aber wahrscheinlich vom periplasmatischen grünen Hof herrührte, denn beim Zuziehen der Immersionsblende verschwand er. Auf dunklem Hintergrund waren dann nur mehr die rot leuchtenden Grana zu sehen.

Unmittelbar nach dem Färben gab es bereits zahlreiche grün fluorochromierte Vakuolen,  $\frac{1}{2}$  Stunde nach Beendigung des Farbbades waren fast alle Vakuolen grün.

In den dickwandigen Randzellen des Schnittes leuchteten die von Plasma erfüllten Tüpfelkanäle sattgrün.

Nach 24 Stunden Verweilen der Schnitte in Schälchen mit farbloser Pufferlösung hatte vollkommene Umlagerung stattgefunden.

In den Epidermiszellen und den darunter liegenden Parenchymzellen der Blattunterseite war ebenfalls Plasma- und Kernfärbung zu beobachten. Die Chloroplasten in den Schließzellen waren ganz erfüllt mit grellgrün fluorochromierter Stärke, so daß sie als Ganzes zu leuchten schienen.

#### *Chlorophytum comosum*

Besonderes Interesse verdienen die Versuche mit *Chlorophytum comosum*. Diese Pflanze wurde als Versuchsobjekt gewählt, weil sich an ihr die Möglichkeit ergab, grüne und panaschierte Blätter und Blatteile und damit auch ergrünte und nichtergrünte Plastiden vergleichend zu untersuchen.

Zunächst wurden Schnitte von der Unterseite eines normal ergrünten Blattes gefärbt. In den Epidermiszellen gab es Plasma-, Kern- und Leukoplastenfärbung. Neben den grün fluorochromierten Leukoplasten lagen auch hier wieder zahlreiche kleine Kügelchen im Protoplasma, die besonders intensiv grün fluoreszieren und oft den Leukoplasten ansaßen. Die Chloroplasten der Schließzellen waren erfüllt von Stärke, die lebhaft grün leuchtete und eine Plastidenfärbung vortäuschte. In toten Schließzellen hingegen, die ebensoviel Stärke in ihren Chloroplasten enthielten, war nichts Grünes zu sehen. Die Plastiden leuchteten grellrot. Dies war besonders schön an Spaltöffnungen zu sehen, deren eine Schließzelle noch lebte, deren andere aber bereits abgestorben war. In den unter der Epidermis gelegenen Parenchymzellen waren die rot leuchtenden Chloroplasten wieder von einem zarten grünen Hof umgeben; die Assimilationsstärke in ihrem Inneren leuchtete grellgrün. Auch hier gab es im Plasma die kleinen, besonders kräftig fluorochromierten Kügelchen.

Nach drei Stunden Verweilen in einem Schälchen mit farblosem Puffer hatten alle Epidermis- und Parenchymzellen grüne Vakuolen. In den Epidermiszellen waren aber auch noch die Leukoplasten und die kleinen Kügel-

chen im Plasma grün fluorochromiert, auch in den Schließzellen gab es neben den bereits grünen Vakuolen noch immer grellgrün fluorochromierte Stärkekörner. Nach 24 Stunden hatten alle Zellen vollkommen umgelagert. Die Vakuolen der Epidermiszellen fluoreszierten smaragdgrün, während die Parenchymzellen-Vakuolen mehr gelbgrün und mit größerer Intensität leuchteten.

Auch in Schnitten, die 3 Stunden und 24 Stunden lang im Uraninfarbbad belassen wurden, gab es nur Plasma-, Kern-, Leukoplasten- und Stärkefärbung. Die Chloroplasten schienen auch nach dieser langen Färbezeit mattrot und waren von einem zarten grünen Hof umgeben. Daneben trat in den 24 Stunden lang gefärbten Schnitten auch Vakuolenfärbung auf. Die Vakuolen der Epidermiszellen waren auch hier smaragdgrün, die der Parenchymzellen hingegen gelbgrün fluorochromiert.

In Schnitten, die 4 Tage lang im Uraninfarbbad lagen, war nur mehr Vakuolenfluoreszenz wahrzunehmen. Von Plasma-, Kern-, Leukoplasten- und Stärkefluoreszenz war nichts mehr zu sehen.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden grüne und panaschierte Pflanzen vergleichend untersucht.

Die Schnitte von der Blattunterseite der grünen Pflanze zeigten das bereits beschriebene Bild. In den Chloroplasten von *Chlorophytum* sind die Grana sehr schön zu sehen. Sie leuchten rot. Trotz angestrengter Beobachtung konnte aber keinerlei Färbung des zwischen den Granen befindlichen Stomas festgestellt werden. Auch in diesen Schnitten waren die im UV-Licht rot leuchtenden Chloroplasten von einem grünen Hof umgeben. Interessant war die Beobachtung, daß in Teilung befindliche, aber noch zusammenhängende Chloroplasten diesen grünen Saum nicht nur an der Peripherie, sondern auch an der Einschnürungsstelle aufweisen (Abb. 3 a).

Schnitte von der Unterseite des panaschierten Blattes wurden so geführt, daß sie sowohl das weiße Feld neben der Mittelrippe als auch den anschließenden grünen Blatteil erfaßten. Die Epidermiszellen beider Areale waren gleich. Plasma, Kerne und Leukoplasten waren grün fluorochromiert. Neben den Leukoplasten gab es auch hier wieder zahlreiche kleine, intensiv grün leuchtende Kügelchen im Protoplasma. Das gequollene Plasma der Schnitt-randzellen leuchtete besonders kräftig. Die Parenchymzellen im grünen Blatteil glichen denen vom normalen grünen Blatt. Anders aber sahen die Parenchymzellen des farblosen Blatteils aus (Abb. 3 b). Hier waren Plasma und Zellkerne ebenfalls grün fluorochromiert, aber auch die Plastiden leuchteten mattgrün. Sie waren allerdings nicht linsenförmig wie im grünen Blatteil, sondern zeigten unregelmäßige amöboide Formen. In diesen mattgrünen Plastiden gab es dann meistens einen, seltener zwei rot fluoreszierende Punkte. Es handelt sich dabei wohl um Proplastiden mit ergrüntem Primärgranum, das sich eben nicht weiter oder bestenfalls in zwei Granen geteilt hat. So entstanden mono- oder digranuläre Plastiden, deren Granen grün, deren Stroma aber farblos ist. In ganz seltenen Fällen gab es im grün fluorochromierten Plastiden ein größeres

rot fluoreszierendes Gebilde (Abb. 3 b, siehe auch Strugger 1954 und Strugger und Losada-Villasante 1956, Abb. 3 und 4). Meist lagen die beiden Grana parallel zueinander (Strugger und Perner 1956, Strugger und Losada-Villasante 1956, Abb. 5). Die der Zellwand in Profilstellung anliegenden Plastiden waren stets an der der Zellwand zugekehrten Seite abgeflacht, gegen die Zellmitte aber vorgewölbt. Die Grana saßen immer am höchsten Punkt dieser Vorwölbung (siehe Abb. 3 c).

Strugger und Losada-Villasante (1956), die Untersuchungen an den Plastiden der albicaten Gewebe von panaschierten *Chlorophytum*-Blättern anstell-

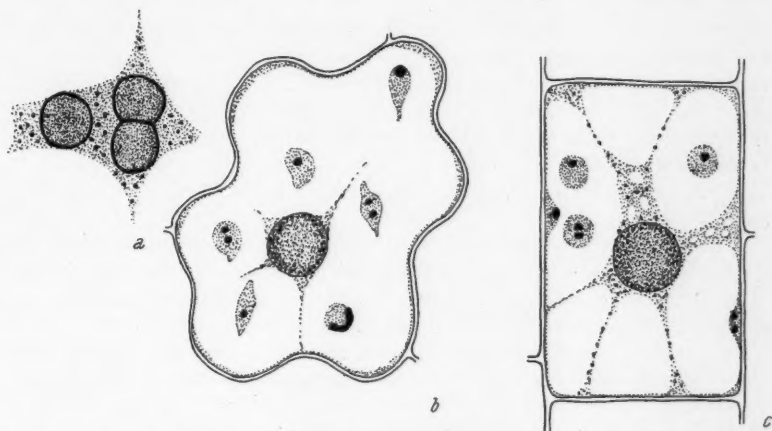


Abb. 3. *Chlorophytum comosum*. a Plasmastrang aus einer Mesophyllzelle des Blattes. Im grün fluorochromierten Protoplasma liegen zahlreiche kleine intensiv grün leuchtende Kügelchen. Die rot fluoreszierenden Chloroplasten sind von einem grünen Saum umgeben, der auch an dem in Teilung befindlichen Chloroplasten gut zu sehen ist. — b Mesophyllzelle aus dem panaschierten Blattfeld. Kern und Plasma sind grün fluorochromiert; ebenso die amöboiden Plastiden, die ein oder zwei ergrünte Granen einschließen. — c Parenchymzelle aus der Luftwurzel. Plasma und Kern sind grün fluorochromiert; ebenso die linsenförmigen Plastiden, die ein oder zwei ergrünte Granen einschließen.

ten, kamen zu dem Ergebnis, daß bei dieser erblichen Panaschierung den Proplastiden das Vermögen zur Metamorphose zu multigranulären lamellierten Chloroplasten verlorengegangen ist. Sie sind im zwar stark durch Plasmawachstum vergrößerten aber eindeutig proplastidischen Stadium steckengeblieben. Sowohl der Stromaleib als auch insbesondere das Granum haben an Größe bedeutend zugenommen, recht häufig sind auch Größenschwankungen der Grana zu beobachten. Eine Ausbildung von stabilen Lamellensystemen im Stroma ist aber wahrscheinlich unterblieben, was durch die amöboide Formveränderlichkeit und durch die leichte Deformierbarkeit im Falle der Ausbildung von Vakuolen im Stroma wohl mit Recht vermutet werden kann. Strugger bezeichnet diese Plastiden daher als herangewachsene, gealterte Proplastiden.

Auch Blätter von normalen grünen Pflanzen, die aber 10 Tage unter einem Dunkelsturz gehalten waren, wurden gefärbt. Und zwar wurden vergleichend Schnitte von alten Blättern, die vor dem Dunkelstellen bereits voll ergrünt waren, und solche von jungen, noch bleichen Blättern untersucht. Die grünen Blätter zeigten auch nach der zehntägigen Verdunklung das normale Bild, allerdings hatten jetzt viele der grün fluorochromierten Leukoplasten eine im UV-Licht dunkel erscheinende Vakuole. Auch an den Zellkernen konnte eine ähnliche Vakuolenbildung öfters beobachtet werden. Die Chloroplasten fluoreszierten mattrot und waren von einem zarten grünen Saum umgeben.

In den Parenchymzellen des jungen bleichen Blattes aber gab es neben solchen mattroten grünesäumten Chloroplasten, die im Hellfeld zart grün erschienen, auch solche, die mattgrün fluoreszierten und ein rot fluoreszierendes ergrüntes Primärgranum aufwiesen. Auch in den Parenchymzellen der bleichen Blattbasis erwachsener grüner Blätter liegen Plastiden, die sich mit Uranin grün fluorochromieren lassen und ein bis zwei rote Granen enthalten.

Auch Längsschnitte durch die Spitze der Luftwurzel wurden gefärbt.

Die Zellen in der vordersten Spitze (Teilungszone), die noch ganz vom Plasma erfüllt sind, leuchten im UV-Licht grellgrün auf. Anschließend an diese Zone liegen Zellen, die — bei schwacher Vergrößerung betrachtet — mattgrün fluorochromierte runde Plastiden beinhalten. Auf den ersten Blick könnte man sie für Leukoplasten halten. Bei stärkerer Vergrößerung wird aber auch hier ein ergrüntes rot fluoreszierendes Primärgranum sichtbar. Seltener gibt es auch zwei Granen oder ein größeres grünes Gebilde (Abb. 3 c). Auch hier lagen die Grana in den der Zellwand anliegenden Plastiden immer an der der Zellmitte zugewandten Oberfläche. Die Plastiden sind aber hier nicht amöboid gestaltet, sondern stets rund, d. h. linsenförmig. In der weiter nach oben zu anschließenden Wurzelzone gibt es dann nur mehr normale grüne Plastiden, deren Stroma sich mit Uranin nicht mehr sichtbar fluorochromieren läßt. Sie fluoreszieren rot und sind von einem zarten grünen Saum umgeben.

#### *Dracaena deremensis*

Die Epidermiszellen der Blattunterseite hatten Plasma und Zellkern grün fluorochromiert. In den Schließzellen leuchteten die ganz mit Stärke angefüllten Chloroplasten scheinbar als Ganzes grün. Erst bei genauer Beobachtung mit der Immersion sind zwischen den einzelnen Stärkekörnern die mattrot durchscheinenden Plastiden zu erkennen.

In den Mesophyllzellen des Blattes lagen rot fluoreszierende Chloroplasten, die von einem zarten grün leuchtenden Saum umgeben waren.

#### *Polygonatum verticillatum*

Untersucht wurden Flächenschnitte vom Blattstiel und Schnitte von der Blattunterseite.

Die Zellen der Blattepidermis und des darunterliegenden Mesophylls hatten Plasma und Zellkern grün fluorochromiert. In den Chloroplasten der Schließzellen



lagen große Stärkekörner, die grellgrün leuchteten. Auch die grünesäumten rot-fluoreszierenden Chloroplasten der Mesophyllzellen enthielten zahlreiche Stärkesplitter, die intensiv grün fluorochromiert waren.

Nach 24 Stunden Aufenthalt im Schälchen mit farlosem Puffer hatten alle Zellen des Schnittes, auch die Schließzellen, vollkommen umgelagert. Die meist in der Zweifzahl vorhandenen Vakuolen der Schließzellen waren deutlich grün. Von Stärkefärbung war im ganzen Schnitt nichts mehr zu sehen.

Die Parenchymzellen des Stengels hatten ebenfalls Plasma und Kerne grün fluorochromiert. Auch hier leuchtete in den rot fluoreszierenden Plastiden die autochthone Stärke intensiv grün.

#### *Urginea maritima*

Untersucht wurden Schnitte von der Blattunterseite. In den Parenchymzellen gab es Plasma- und Kernfärbung. Die rot fluoreszierenden Chloroplasten waren von einem grünen Hof umgeben.

#### Amaryllidaceae

##### *Clivia nobilis*

Die Epidermiszellen der Blattunterseite zeigten Kern- und Plasmafärbung. Die Chloroplasten der Schließzellen enthielten auch hier wieder zahlreiche Stärkekörner, die intensiv grün leuchteten. In den unter der Epidermis gelegenen Parenchymzellen waren Plasma und Zellkern ebenfalls grün fluorochromiert. Die Plastiden leuchteten rot.

Nach 24 Stunden Verweilen des Schnittes in farbloser Pufferlösung waren die Epidermiszellen abgestorben, die Parenchymzellen hatten den Farbstoff vom Plasma zur Vakuole umgelagert.

##### *Eucharis grandiflora*

Untersucht wurden Flächenschnitte vom Blattstiel und Schnitte von der Blattunterseite.

In den Epidermiszellen der Blattunterseite waren Zellkern und Plasma grün fluorochromiert; daneben gab es im Plasma noch kleine, grün leuchtende Kügelchen. Die Plastiden der Schließzellen waren vollgefüllt mit Stärke und schienen als Ganzes grellgrün zu leuchten. In vereinzelt, toten Schließzellen gab es nur mehr grellrot fluoreszierende Chloroplasten. Die hier ebenfalls vorhandene Stärke in den Plastiden war nicht mehr sichtbar fluorochromiert.

Kern und Plasma der Stengel-Epidermiszellen waren ebenfalls grün fluorochromiert. Auch hier gab es, wie in den Zellen der Blattepidermis, zahlreiche kleine, grün fluoreszierende Kügelchen im Plasma. Die Plastiden der Schließzellen waren ganz erfüllt von Stärke und schienen als Ganzes grün zu leuchten. Bei genauer Beobachtung sah man aber zwischen den einzelnen grellgrün leuchtenden Stärkekörnern schmale, matt dunkelrote Streifen.

Nach 24 Stunden hatten sowohl die Epidermiszellen als auch die Schließzellen vollkommen umgelagert.

##### *Haemanthus Catharinae*

In den Epidermis- und Mesophyllzellen des Blattes waren Kerne und Plasma grün fluorochromiert. Die Chloroplasten in den Mesophyllzellen leuchteten rot und waren von einem grünen Saum umgeben. Innerhalb der Plastiden war nichts Grünes zu sehen. Ein Kontrollversuch mit JKJ zeigte, daß hier in den Chloroplasten keine Assimilationsstärke vorhanden war.

Nach 24 Stunden hatten die Zellen vollkommen umgelagert. Die Vakuolen

waren jetzt grün, Plasma und Kerne fluoreszierten nicht mehr. Das Plasma der im Schnitt vorhandenen toten Zellen fluoreszierte noch ganz matt grüngelb, die Plastiden leuchteten blutrot.

#### Commelinaceae

##### *Rhoeo discolor*

Untersucht wurden Schnitte von der Blattunterseite. In den Epidermiszellen waren Kerne, Plasma und Leukoplasten grün fluorochromiert. In den Schließzellen gab es neben Kern- und Plasmafärbung auch grellgrün fluorochromierte Plastidenstärke. Wieder waren die Plastiden ganz von Stärke erfüllt und schienen als Ganzes grün zu leuchten. In den Mesophyllzellen waren die besonders großen, rot fluoreszierenden Chlorophyllkörner von einem zarten grünen Hof umgeben. In vielen Zellen gab es bereits leichte Vakuolenfärbung. Das gequollene Plasma der Randzellen war auch hier wieder besonders kräftig fluorochromiert.

Nach 48 Stunden Aufenthalt des Schnittes in einem Schälchen mit farblosem Puffer hatten viele Nebenzellen der Schließzellen umgelagert; ihre Vakuolen fluoreszierten grün. Sonst war im ganzen Schnitt nichts Grünes mehr zu sehen.

##### *Setcreasea purpurea*

Untersucht wurden Flächenschnitte von der Blattunterseite und Längsschnitte durch den Stengel.

In den Epidermiszellen der Blattunterseite waren Kern, Plasma und Leukoplasten lebhaft grün fluorochromiert. In den Plastiden der Schließzellen gab es reichlich Stärke, die lebhaft grün fluoreszierte und eine Plastidenfärbung vortäuschte. Bei Betrachten mit der Immersion aber war deutlich zwischen den einzelnen Stärkekörnern die matt dunkelrot durchscheinende Plastidensubstanz wahrzunehmen. In den toten Schließzellen gab es keinerlei Grünfärbung mehr, obwohl auch dort die Plastiden voll Stärke waren. Auch hier waren im Plasma wieder kleine, kräftig grün fluorochromierte Kügelchen zu sehen, die besonders dicht um die Leukoplasten gelagert waren. Um jeden Leukoplasten saßen eine Reihe solcher Kügelchen und bildeten so ein verkleinertes Abbild des von Leukoplasten umsäumten Zellkernes.

Nach 24 Stunden hatten die Epidermiszellen vollkommen umgelagert. Die Vakuolen waren grün; Plasma, Kerne und Leukoplasten fluoreszierten nicht mehr. Auch von Stärkefärbung war im ganzen Schnitt nichts mehr zu sehen.

An den Längsschnitten durch den Stengel waren in den Rindenzellen die Zellkerne und, kaum merklich, auch das Plasma grün fluorochromiert. Die Plastiden erschienen im UV-Licht rot und waren von einem zarten grünen Saum umgeben, der hier merklich stärker fluoreszierte als das Plasma. Die Assimilationsstärke in den Chloroplasten war grellgrün fluorochromiert (Abb. 4).

Nach 24 Stunden Aufenthalt der Schnitte im farblosen Puffer hatten die Zellen umgelagert. Die Zellsäfte waren mattgrün; Kern, Plasma und Stärke waren nicht mehr fluorochromiert. Auch die Chloroplasten hatten keinen grünen Saum mehr.

Um zu prüfen, ob längere Farbeinwirkung nicht doch zu einer Färbung der Chloroplasten führt, wurden Längsschnitte vom Stengel auch 1½, 3 und 24 Stunden lang im Uraninfarbbad belassen. Aber auch nach dieser langen Färbezeit war in den Chloroplasten außer der grün-fluorochromierten Stärke und dem zarten grünen Saum nichts Grünes zu sehen.

Mit Schnitten von der Blattunterseite wurde ein pH-Reihenversuch angestellt:

pH 2,4: Die Kerne der Epidermiszellen leuchten schwach grün, die Stärke in den Plastiden der Schließzellen ist leuchtend grün fluorochromiert. Die Leukoplasten sind verschwunden. Viele Zellen haben auch die Vakuole grün fluorochromiert.

pH 4,8: In den Epidermiszellen sind Plasma, Kerne und Leukoplasten grün fluorochromiert. Auch die Schließzellen haben Plasma- und Kernfärbung. Besonders kräftig fluorochromiert ist die Stärke in den Plastiden der Schließzellen und der Mesophyllzellen. In toten Zellen gibt es keinerlei Grünfluoreszenz.

pH 6,0: Die Schnitte boten das gleiche Bild wie in pH 4,8.

pH 8,0: Hier gab es weder Kern- noch Plasmafärbung. Auch die Leukoplasten und die Plastidenstärke waren nicht mehr fluorochromiert.

#### *Tradescantia purpusi*

Auch hier wurden Längsschnitte durch den Stengel und Flächenschnitte von der Blattunterseite gefärbt.

In den Epidermiszellen der Blattunterseite waren Plasma und Zellkern und vor allem die Leukoplasten grün fluorochromiert. Im gleichmäßig grün erscheinenden Plasma gab es auch hier wieder zahlreiche kleine, intensiv grün fluoreszierende Kügelchen, die besonders um die Leukoplasten herum angereichert waren (Abb. 5). Zahlreiche Zellen hatten bereits mattgrün leuchtende Vakuolen, die im Hellfeld gelb erschienen. In den Mesophyllzellen des Blattes liegen verhältnismäßig große Chloroplasten, die z. T. ganz von grellgrün fluorochromierter Stärke erfüllt waren und so als Ganzes grün zu leuchten schienen. Bei genauer Betrachtung waren aber die schmalen dunklen Streifen zwischen den einzelnen Stärkekörnern deutlich zu sehen. Auch in diesen Meso-

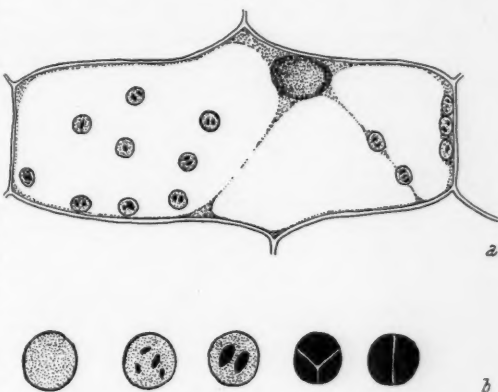


Abb. 4. *Setcreasea purpurea*. a Parenchymzelle aus dem Stengel. Der Zellkern ist stark, das Plasma aber nur ganz schwach grün fluorochromiert. In den rot leuchtenden Chloroplasten, die von einem grünen Saum umgeben sind, leuchtet die Assimilationsstärke intensiv grün. — b Chloroplasten in verschiedenen Stadien der Stärkespeicherung.

phyllzellen waren die kleinen Kügelchen im Plasma intensiv fluorochromiert. In den Chloroplasten der Schließzellen war die Stärke ebenfalls grellgrün fluorochromiert. Nach 24 Stunden Aufenthalt der Schnitte in farbloser Pufferflüssigkeit hatten alle Zellen umgelagert. Ihre Vakuolen fluoreszierten mattgrün; Plasma, Kern, Leukoplasten und Stärke zeigten keinerlei Grünfluoreszenz mehr.

An den Stengellängsschnitten war auffallend, daß die Kerne wesentlich stärker fluorochromiert waren als das Plasma. Dieses leuchtete nur ganz matt und zart grün, oft war die Färbung kaum wahrnehmbar. Der zarte grüne Hof um die Plastiden war jedoch auch hier stets zu sehen und leuchtete in allen Fällen stärker als das Plasma. Zahlreiche Plastiden waren auch hier wieder von großen Stärkekörnern erfüllt und schienen als Ganzes zu leuchten. In vielen Zellen war neben Plasma-, Kern- und Stärkefluoreszenz auch bereits Vakuolenleuchten zu sehen. Nach 24 Stunden hatten alle noch lebenden Zellen des Schnittes vollkommen umgelagert.

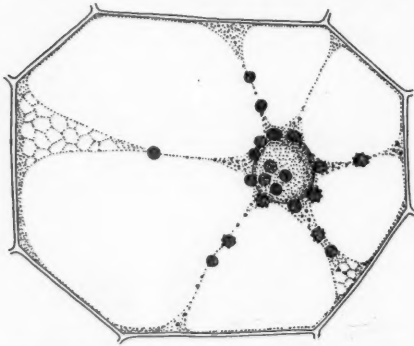


Abb. 5. *Tradescantia purpusi*, Epidermiszelle der Blattunterseite. Plasma, Zellkern und Leukoplasten sind grün fluorochromiert.

#### *Tradescantia virginica*

Gefärbt wurden Schnitte von der Blattunterseite. In den Epidermiszellen waren Kerne und Plasma grün fluorochromiert. Auch die Leukoplasten fluoreszierten grün. Die Stärke in den Chloroplasten der Schließzellen war intensiv grün fluorochromiert. In den Mesophyllzellen des Blattes gab es ebenfalls Plasma- und Kernfärbung. Die großen Chloroplasten leuchteten rot und waren von einem grünen Hof umgeben. In Schnitten, die vom Blattgrund entnommen waren, gab es in den

Chloroplasten sehr viele Stärkekörnchen, die grellgrün leuchteten und so eine Färbung der Chloroplasten vortäuschten. Nach 24 Stunden Aufenthalt im Puffer hatten die Zellen umgelagert, von Plasma-, Kern-, Leukoplasten- und Stärkefärbung war nichts mehr zu sehen.

#### *Tradescantia zebrina*

Gefärbt wurden Schnitte von der Blattunterseite. Die Epidermiszellen zeigten grüne Kern-, Plasma- und Leukoplastenfluoreszenz. In vereinzelten Zellen gab es nach dieser kurzen Färbezeit auch schon mattgrüne Vakuolenfluoreszenz. Diese Vakuolen erschienen im Hellfeld gelb. In den Chloroplasten der Schließzellen waren die zahlreich vorhandenen Stärkekörner grellgrün fluorochromiert. Die Chloroplasten der Mesophyllzellen leuchteten rot und waren von einem zarten grünen Saum umgeben. Die vereinzelt in ihnen eingeschlossenen Stärkekörner fluoreszierten grellgrün. Nach 3 Stunden Färbedauer zeigten alle Zellen bereits grüne Vakuolenfluoreszenz, daneben waren aber Kerne, Plasma, Leukoplasten und Stärkekörner ebenfalls grün fluorochromiert. An der Färbung der Chloroplasten hatte sich auch nach dieser langen Färbezeit nichts geändert. In Schnitten, die 4 Tage lang in der Farbstofflösung lagen, zeigten die überlebenden Zellen nur mehr Vakuolenfärbung.

## Orchidaceae

*Cephalanthera alba*

In den Epidermiszellen der Blattunterseite waren Plasma und Zellkerne grün fluorochromiert. Die Chloroplasten der Schließzellen waren erfüllt von Stärkekörnern, die grellgrün fluoreszierten und eine Plastidenfärbung vortäuschten. Die Chloroplasten in den Mesophyllzellen des Blattes leuchteten rot und waren von einem grünen Saum umgeben.

*Coelogyne cristata*

Die Epidermiszellen der Blattunterseite zeigten kräftige grüne Kern- und Plasmafluoreszenz. Die Plastiden der Schließzellen waren vollgefüllt mit großen Stärkekörnern, die grellgrün leuchteten und so eine Plastidenfärbung vortäuschten.

*Cypripedium insigne*

Die Epidermiszellen der Blattunterseite zeigten grüne Plasma- und Kernfluoreszenz. Die Plastiden der Schließzellen waren erfüllt von grellgrün leuchtenden Stärkekörnern. Dadurch schien bei flüchtiger Beobachtung Plastidenfluoreszenz vorzuliegen. Bei entsprechend stark vergrößernder Optik aber waren deutlich dunkle Streifen zwischen den einzelnen grell fluorochromierten Stärkekörnern wahrzunehmen. In den Mesophyllzellen, die ebenfalls Kern und Plasma grün fluorochromiert hatten, leuchteten die Plastiden rot und waren von einem zarten grünen Saum umgeben.

*Dendrobium moschatum*

In den Epidermiszellen der Blattunterseite waren Plasma und Zellkern grün fluorochromiert. Die Chloroplasten der Schließzellen enthielten zahlreiche kleine Stärkekörnchen, die intensiv grün leuchteten. Die Plastiden der Mesophyllzellen fluoreszierten rot und waren von einem grünen Hof umgeben. Die fallweise in ihnen vorhandene Assimilationsstärke war grellgrün fluorochromiert. Zwischen den subepidermal gelegenen Mesophyllzellen gab es zahlreiche Plasmodiesmen, die lebhaft grün fluoreszierten.

*Epipactis latifolia*

Die Epidermiszellen der Blattunterseite zeigten grüne Plasma- und Kernfluoreszenz. Die im Hellfeld gerade noch sichtbar grün gefärbten Plastiden fluoreszierten rot und waren von einem zarten grünen Saum umgeben. In den Chloroplasten der Schließzellen lagen zahlreiche große intensiv grün leuchtende Stärkekörner, die eine Plastidenfärbung vortäuschten. Die unter der Epidermis gelegenen Mesophyllzellen hatten ebenfalls Plasma und Zellkern grün fluorochromiert. Die Chloroplasten leuchteten rot und waren wieder grün gesäumt.

*Haemaria discolor*

Untersucht wurden Flächenschnitte vom Stengel und von der Blattunterseite.

In den Epidermiszellen des Stengels waren Zellkern und Protoplasma, aber auch die stäbchenförmigen Leukoplasten grün fluorochromiert. Am kräftigsten leuchteten aber hier die Zellkerne, die Leukoplasten schienen nur mattgrün. In vereinzelten Randzellen des Schnittes leuchtete das gequollene Plasma wieder besonders grellgrün. Vereinzelt subepidermal gelegene Zellen (nicht die Raphidenzellen) hatten bereits Vakuolenfärbung. Die Raphidenbündel erschienen matt grau-grün. Die in den Parenchymzellen liegenden Chloroplasten leuchteten rot und waren von einem zarten grünen Saum umgeben.

Auch in den Epidermiszellen der Blattunterseite waren Plasma, Zellkern und die stäbchenförmigen Leukoplasten grün fluorochromiert. Die Plastiden der Schließzellen waren erfüllt von intensiv grün leuchtenden großen Stärkekörnern, die Plastidenfärbung vortäuschten. In den Mesophyllzellen waren ebenfalls Plasma und Zellkern grün fluorochromiert. Um die mattrot fluoreszierenden Chloroplasten war wieder der zarte grüne Saum zu sehen.

#### *Ordis morio*

Gefärbt wurden Schnitte von der Blattunterseite und vom Stengel.

In den Epidermiszellen der Blattunterseite waren Plasma und Zellkern kräftig grün fluorochromiert. Am stärksten aber leuchteten die Leukoplasten, die hier eine kleine Vakuole beinhalteten, die im UV-Licht dunkel erschien. Die Chloroplasten der Mesophyllzellen leuchteten rot und waren grün gesäumt. Assimilationsstärke war hier keine vorhanden. Das in vereinzelten Randzellen stark gequollene Protoplasma war auch hier wieder besonders kräftig fluorochromiert.

Auch in den Epidermiszellen des Stengels gab es Plasma-, Kern- und Leukoplastenfärbung.

Mit Schnitten von der Blattunterseite wurde ein pH-Reihenversuch durchgeführt:

pH 2,04: Die meisten Zellen des Schnittes sind tot, in den noch lebenden Zellen sind Plasma, Kern und Leukoplasten grün fluorochromiert. Die kleine Vakuole in den Leukoplasten erscheint im UV-Licht dunkel.

pH 4,8: Alle Zellen des Schnittes leben und haben kräftige Plasma-, Kern- und Leukoplastenfärbung.

pH 6,0: Die Vakuolen der Epidermiszellen erscheinen stumpf rotbraun. Kern und Plasma sind nur mehr schwach grün fluorochromiert. Die Leukoplasten fluoreszieren nicht mehr. In den Schließzellen sind Kern und Plasma wesentlich kräftiger fluorochromiert als in den Epidermiszellen.

pH 8,0: Im ganzen Schnitt ist nichts Grünes mehr zu sehen. Die Vakuolen der Epidermiszellen fluoreszieren schmutzig kaffeebraun, die der Schließzellen rotbraun.

#### *Platanthera bifolia*

In den Epidermiszellen der Blattunterseite waren Plasma, Zellkern und Leukoplasten grün fluorochromiert. Die zahlreich vorhandenen Stärkekörner in den Chloroplasten der Schließzellen leuchteten grellgrün. Auch in den Mesophyllzellen des Blattes waren Plasma und Zellkern grün fluorochromiert, die Chloroplasten fluoreszierten mattrot und waren von einem zarten grünen Saum umgeben.

#### *Stanhopea tigrina*

In den Epidermiszellen der Blattunterseite waren Plasma und Zellkerne grün fluorochromiert, ebenso in den Mesophyllzellen. Die Chloroplasten fluoreszierten mattrot und waren von einem grünen Hof umgeben. Die Chloroplasten der Schließzellen hingegen schienen grün fluorochromiert. Sie waren ganz erfüllt von großen intensiv grün leuchtenden Stärkekörnern, die eine Plastidfluoreszenz vortäuschten.

Ein gleiches Bild zeigten Flächenschnitte vom Stengel. Hier waren auch in den Chloroplasten der Parenchymzellen kleine Stärkesplitter vorhanden, die grellgrün leuchteten.



**Araceae*****Philodendron fragrantissimum***

Untersucht wurden Schnitte von der Blattunterseite der Nebenblätter. In den Epidermiszellen war im allgemeinen nur Plasma- und Kernfärbung zu sehen, wobei im Plasma zahlreiche kleine Kügelchen lagen, die besonders intensiv grün leuchteten. In den Zellen in der Umgebung der Schließzellen gab es außerdem noch Leukoplasten, die ebenfalls grün fluorochromiert waren.

**2. Stärkefärbung**

Bei den vorangegangenen Versuchen zeigte sich immer wieder, daß die in den Chloroplasten vorhandene Assimilationsstärke sich ebenso, wie das Plasma in intakten Zellen, in einem bestimmten pH-Bereich mit Uranin fluorochromieren läßt, in toten Zellen aber nicht mehr färbbar ist. Die großen Reservestärkekörner aus dem Stengelmark von *Pellionia Daveauana*, an denen keine Plastidenreste mehr zu sehen waren, färbten sich mit Uranin aber auch dann noch, wenn sie außerhalb der lebenden Zellen lagen. Um nun zu prüfen, wie weit Reservestärke, aber auch käufliche Stärke, mit Uranin fluorochromierbar ist, wurden weitere Versuche angestellt. Dazu wurden Kartoffelschnitte, aber auch käufliche Kartoffelstärke, einer Uraninfärbung unterzogen; ebenso Schnitte durch verschiedene Samen, und zwar im trockenen und im vorgequollenen Zustand. Neben der käuflichen Kartoffelstärke wurde auch Stärke von Weizen und Maranta mit Uranin fluorochromiert.

***Solanum tuberosum***

Gefärbt wurden Schnitte durch die Kartoffelknolle. Nach der Uraninbehandlung fluoreszierten Plasma und Zellkerne grün, auch die im Schnitt vorhandenen Eiweißwürfel leuchteten grün. Besonders intensiv grün leuchteten aber die Stärkekörner, und zwar waren innerhalb des Schnittes nur die Stärkekörner lebender Zellen gefärbt. Daneben waren aber auch die aus den angeschnittenen Zellen herausgefallenen und jetzt neben dem Schnitt liegenden Stärkekörner leuchtend grün.

Auch Kartoffelschnitte wurden in einer pH-gestufen Farbbadreihe untersucht.  
pH 4,8: Kerne, Plasma, Stärkekörner und Eiweißkristalle leuchten lebhaft grün.

pH 6,0: Die Schnitte zeigten das gleiche Bild wie die bei pH 4,8 fluorochromierten.

pH 7,1: Auch hier sind Zellkern, Plasma und Stärkekörner grün fluorochromiert.

pH 8,0: Plasma und Zellkerne sind nicht mehr sichtbar fluorochromiert, die Stärkekörner hingegen leuchten noch mattgrün.

pH 8,75: Auch hier erscheinen die Stärkekörner noch mattgrün fluorochromiert.

**Käufliche Kartoffelstärke**

Bei der Färbung wurde auf folgende Weise vorgegangen: Etwas Kartoffelmehl wurde in einem kleinen Glasschälchen mit der Uraninlösung überschichtet. Nach 15 Minuten Färbezeit wurde die Farbflüssigkeit ab-

geschüttet und so lange durch farblosen Puffer ersetzt, bis die Waschflüssigkeit vollkommen fluoreszenzfrei war. Anschließend wurde im UV-Mikroskop beobachtet. Vom dunklen Grund hoben sich die grün fluorochromierten Stärkekörner ab, an denen die Schichtung besonders gut zu sehen war. Es wechseln dabei intensiv grün fluorochromierte mit dunklen matt graugrün erscheinenden Schichten ab. Die innerste Schicht ist meist intensiv grün. Im Inneren des Stärkekornes sind die beiden Schichten ziemlich gleich breit, nach außen zu werden sie schmaler, und zwar



Abb. 6. *Solanum tuberosum*, Stärkekörner mit Uranin fluorochromiert. Intensiv grün fluoreszierende Schichten wechseln mit dunklen, kaum merklich grün leuchtenden Schichten ab.

nehmen vor allem die dunklen Schichten stark an Mächtigkeit ab. Die Außenkontur der Stärkekörner leuchtet besonders stark auf und ist nicht gleichmäßig dick. Meist ist zwischen der letzten grünen Schicht und der hell leuchtenden Außenkontur eine fast schwarz erscheinende schmale Zone eingeschaltet (Abb. 6).

Die Färbung der Kartoffelstärke ließ sich auch im alkalischen Milieu bei pH 11,4 erzielen. Auch an diesen Körnern war die Schichtung noch verhältnismäßig gut zu sehen. Zusatz von starker HCl beeinflusste die Färbung nicht. Auch nach 15 Minuten während der Bestrahlung mit der starken UV-Lampe war keinerlei Veränderung in der Fluoro-

chromierung zu sehen. Nach 24 Stunden Aufenthalt in farbloser Pufferlösung erschienen die Stärkekörner nur mehr ganz schwach grün fluorochromiert.

#### *Pisum sativum*

In gefärbten Schnitten von trockenen Erbsen leuchteten nur die Ränder der Stärkekörner merklich auf, an Schnitten durch vorgequollene Erbsen hingegen waren die Stärkekörner als Ganzes grün fluorochromiert. (Vgl. Höfler, Ziegler, Luhan 1956, Abb. 14.)

#### *Phaseolus multiflorus*

In gefärbten Schnitten vom trockenen und vom gequollenen Samen leuchteten die Stärkekörner grün auf, die Trockenrisse in den Körnern erschienen im UV-Licht schwarz. Auch die aus dem Schnitt herausgefallenen Stärkekörner leuchteten lebhaft grün. In den vorgequollenen Samen leuchtete auch das Plasma grün, wogegen in den trockenen Samen keinerlei Plasmafluoreszenz zu sehen war. Die Beobachtung, daß sich bei der Bohne das Grundprotoplasma stärker anfärbt als die Stärkekörner, so daß diese sich dunkel vom lichten Untergrund abheben (Höfler, Ziegler, Luhan 1956, Abb. 15), konnte hier nicht wieder gemacht werden. Die Art der Färbung scheint stark vom jeweiligen Wassergehalt abzuhängen.

#### *Vicia faba*

In Schnitten von trockenen und vorgequollenen Samen färbten sich die Stärkekörner mit Uranin zu grüner Fluoreszenz. Auch das Plasma war grün fluorochromiert. Die neben dem Schnitt liegenden Stärkekörner leuchteten ebenfalls grün.

*Soja hispida*

Im trockenen und im vorgequollenen Samen war die Stärke nach Uraninbehandlung grün fluorochromiert. Auch außerhalb des Schnittes liegende Stärkekörner leuchteten grün.

*Triticum vulgare*

Schnitte von trockenen und von gequollenen Körnern zeigten das gleiche Färbeargebnis. Die Stärkekörner waren grün fluorochromiert, auch die außerhalb des Schnittes liegenden Körner leuchteten grün. Die einzelnen Körner leuchteten hier aber mit sehr unterschiedlicher Intensität. Oft war der Rand besonders intensiv grün, das Innere des Stärkekornes aber nur mattgrün. Zwischen dem inneren mattgrün leuchtenden Teil und der stark fluoreszierenden Hülle war auch hier, wie beim Kartoffel-Stärkekorn, eine im UV-Licht dunkel erscheinende Zone zu sehen. Auch das Plasma war stark fluorochromiert, es leuchtete meist sogar intensiver grün als die Stärke. Die Aleuronschicht leuchtete besonders lebhaft grün. Anscheinend war es das Plasma, das so besonders intensiv fluorochromiert war.

*Secale cereale*

Auch hier leuchteten die Stärkekörner, sowohl die in den Zellen als auch die außerhalb des Schnittes gelegenen, kräftig grün.

*Avena sativa*

Hier wurden nur Schnitte von trockenen Körnern untersucht. Die Stärkekörner, und zwar die zusammengesetzten wie auch die Einzelkörner, leuchteten grün. Auch die außerhalb des Schnittes liegenden Körner waren grün fluorochromiert. Die Zellen der Aleuronschicht leuchteten hier ebenfalls intensiv grün.

*Zea mays*

Hier leuchtete nur der Rand der Stärkekörner intensiv, das Innere erschien nur matt blaugrün.

*Fagopyrum repens*

Es wurden nur trockene Samen untersucht. Alle Stärkekörner, auch die aus dem Schnitt herausgefallenen, waren mattgrün fluorochromiert.

*Ricinus communis*

Da bei den Getreidekörnern die Aleuronschicht immer besonders stark fluorochromiert war, wurden auch Schnitte von Ricinussamen, die ja besonders große Aleuronkörner enthalten, mit Uranin fluorochromiert. Nach der Färbung leuchtete das Plasma kräftig grün, besonders lebhaft schienen aber die Aleuronkörner zu leuchten. Bei stark vergrößernder Optik zeigte sich aber, daß es nicht die Aleuronkörner als solche waren, die das Uranin so stark speichern. Es waren vielmehr die in den Aleuronkörnern liegenden Eiweißkristalloide. An ungefärbten Schnitten, die im farblosen Puffer von pH 4,8 lagen, waren die Eiweißkristalloide auch im Hellfeld besonders gut zu sehen.

### C. Besprechung der Versuchsergebnisse

Beim Betrachten der Färbeargebnisse an den verschiedensten Pflanzen fiel auf, daß erwachsene Chloroplasten mit Uranin nicht zur Fluoreszenz gebracht werden können. Sie erscheinen auch noch nach stunden- und tage-

langer Einwirkung des Uraninfarbbades im UV-Licht in ihrer roten Eigenfluoreszenz. Nur ein schmaler grüner Saum, der diese Chloroplasten umgibt, ist zu sehen. Er kann schmaler oder breiter, deutlicher oder weniger deutlich sichtbar sein, aber er wurde immer wieder beobachtet und ist bei den Plastiden ein und derselben Zellsorte in gleicher Weise ausgebildet.

Anders verhielten sich die Leukoplasten der Epidermiszellen. Sie waren in allen Fällen mit Uranin fluorochromierbar und leuchteten mehr oder weniger intensiv grün. In vereinzelten Fällen fanden sich in der Epidermis Plastiden, die im Hellfeldmikroskop zunächst für Leukoplasten gehalten wurden, die sich aber mit Uranin nicht färbten. Bei genauer Untersuchung im Fluoreszenzmikroskop erwiesen sie sich als zart rot fluoreszierend, waren also bereits ergrünt.

Die Proplastiden eines im Dunkel erzogenen *Phaseolus*-Pflänzchens fluoreszierten nach Uraninbehandlung ebenfalls grün. In den ergrünenden *Chlorophytum*-Blättern lagen in ein und derselben Zelle Plastiden, die im Hellfeld grün erschienen und mit Uranin nicht fluorochromierbar waren und solche, die noch vollständig farblos erschienen, amöboide Gestalt zeigten und nach Uraninfärbung grün fluoreszierten. In den Mesophyllzellen der panaschierten Blätter von *Chlorophytum comosum* gibt es ebenfalls amöboid gestaltete Plastiden, die mit Uranin grün fluorochromierbar sind. Sie enthalten meist einen, seltener zwei rot fluoreszierende Einschlusskörper, die im Hellfeldmikroskop als kleine grüne Scheibchen zu sehen sind und zunächst winzig kleine Chloroplasten vortäuschen. Erst bei genauerem Zusehen wird auch die amöboide farblose Masse, in der diese grünen Körnchen eingebettet liegen, wahrgenommen. Es handelt sich dabei wohl um Proplastiden mit ergrünem Primärgranum (Strugger 1950, 1951, 1953, Strugger und Losada-Villasante 1956, Strugger und Perner 1956, Böing 1956). Auch in den unmittelbar auf die Teilungszone folgenden Zellen der Luftwurzel von *Chlorophytum comosum* wurden farblose Plastiden mit einem oder zwei ergrünenden Granen gefunden, die hier aber nicht amöboid, sondern bereits linsenförmig gestaltet waren. Mit Uranin waren sie grün fluorochromierbar.

Es gab also unter den zahlreichen untersuchten Plastiden solche, deren Stroma mit Uranin fluorochromierbar war, und solche, die sich mit Uranin nicht zur Gesamtfluoreszenz bringen ließen und nur von einem zarten grün leuchtenden Hof umgeben waren. Alle Fluorochromierungen waren aber nur in dem pH-Bereich möglich, in dem auch das Plasma der betreffenden Zellen färbbar war.

Nun sind über die ontogenetische Entwicklung der Chloroplasten im Verlaufe der letzten 10 Jahre zahlreiche licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen veröffentlicht worden. Der Großteil dieser Arbeiten stammt von Strugger (1950, 1951, 1953, 1954, 1956, 1957) und seinen Mitarbeitern (Grave 1954, Kaja 1954, Fasse-Franzisket 1955, Perner 1956, Böing 1956), aber auch von Heitz und Maly (1953), Düvel (1954), Mühlethaler (1956, 1959), Sitte (1958) und Mühlethaler und Frey-Wyssling (1959) liegen Untersuchungen auf diesem Gebiet vor. Alle diese Arbeiten haben gezeigt, daß die Pla-

stiden der höheren Pflanze einen bestimmten, komplizierten Entwicklungsgang durchmachen. Strügger und seine Mitarbeiter sind auf Grund ihrer Beobachtungen der Meinung, daß sich die grünen Plastiden aus den sogenannten „Proplastiden“ entwickeln, die nur aus einem amöboiden Stroma und aus einem von Anfang an vorhandenen Primärgranum bestehen. Dieses Primärgranum wird nach Strügger von früheren Plastiden übernommen und vermehrt sich während der Plastidenentwicklung durch identische Reduplikation. Dabei entstehen zunächst zwei übereinanderliegende Tochtergranen. Während der folgenden Teilungen sollen dann einzelne Grana seitlich herausgleiten, wodurch die Entstehung neuer benachbarter Granasäulen möglich wird. Auch Mühlethaler schloß sich zunächst dieser Strüggerschen Auffassung an und brachte in seiner 1956 erschienenen Arbeit über die Struktur und Entwicklung der Proplastiden ein Schema der Plastidenentwicklung (Abb. 18), aus dem zu ersehen ist, daß sich in den Proplastiden, die zunächst nur ein primäres Granum enthalten, vorerst Stärke und Fett bilden können, die dann im weiteren Verlauf der Entwicklung wieder verschwinden. Nach ihrem Verschwinden beginnen sich aus dem Primärgranum Stromalamellen zu entwickeln. Der fertige grüne Chloroplast besteht dann aus einem lamellierten Stroma, dem die ebenfalls lamellierten Grana eingebettet sind, und dem Peristromium (siehe auch Perner 1956 b, S. 572, und Mühlethaler 1957, Abb. 10). Diesen Abschnitt bezeichnet Mühlethaler als „Entwicklungsphase“ der Plastiden. Während dieser Phase sind die Plastiden zum Großteil amöboid. Auf sie folgt die Teilungsphase. Das stärkefreie, aber bereits vollergrüne Chlorophyllkorn teilt sich dabei durch Einschnürung und bildet so zwei grüne assimilationsfähige Jungchloroplasten. Hier beginnt nun nach Mühlethaler die Arbeitsphase der Plastiden.

Die Existenz eines von Anfang an in den Proplastiden vorhandenen Primärgranums wurde aber von Heitz und Maly (1953), Düvel (1954) und anderen auf Grund ihrer negativen Versuchsergebnisse bestritten. Sie sind vielmehr der Meinung, daß sich die Grana erst während der Plastidenentwicklung im Stroma bilden. Auch haben elektronenmikroskopische Untersuchungen verschiedener Autoren — darunter Perner (1956) und Mühlethaler (1955) — ergeben, daß die Struktur der Primärgranen keine morphologische Ähnlichkeit mit den Granen, die sich in erwachsenen funktionstüchtigen Chloroplasten finden, aufweist. Sie bestehen vielmehr aus zahlreichen Elementarpartikelchen, die bei einigen Pflanzen, z. B. bei *Chlorophytum comosum*, zu kristallgitterartigen Körpern geordnet sind (Perner 1956 a, Abb. 6—14, Mühlethaler 1959, Abb. 7). Hodge, McLean und Mercer (1956) nannten dieses Primärgranum, das ja als Bildungszentrum für die sich später entwickelnden Stroma- und Granalamellen anzusehen ist, „prolamellar body“. Sie sahen diesen Körper an etiolierten Pflanzen als kompakte Ansammlung kleiner Partikel von Bläschenstruktur. Bereits bei geringer Belichtung bildet sich dann aus ihnen die typische Lamellarstruktur, und zwar durch kettenartiges Aneinanderreihen der Bläschen. Die endgültige Lamellenzahl des Chloroplasten entsteht aber nach dem Belichten und dem Verschwinden des Primärkörpers durch eine Neubildung von der Peripherie aus. Und zwar sollen in der als Peristromium bezeichneten Außenzone der Plastiden zuerst kleinste, vakuolenähnliche Bläschen entstehen, die dann zu flachen Zisternen verschmelzen. Dies steht aber im Gegensatz zu der von Strügger geforderten genetischen Kontinuität der Primärgranen. Nun erschien jüngst eine Abhandlung von Mühlethaler und Frey-Wyssling (1959), die sich mit Untersuchungen der frühesten Proplastidenstadien in den Embryosackanlagen verschiedener Liliaceen, im Vegetationskegel von *Elodea canadensis* und in Knospen von *Begonia*-Blattstecklingen befaßt (siehe auch Mühlethaler

1959). Nach den Angaben der beiden Autoren soll die Entwicklung der Plastiden auf folgende Weise vor sich gehen: Die submikroskopischen Proplastiden, die noch keine Innenstruktur zeigen und zunächst um 20 bis 50  $\mu$  Durchmesser besitzen, wachsen bis zu einer Größe von 0,6 bis 2  $\mu$  heran. Dann beginnt die Entwicklung der Plastiden-Innenstruktur durch Einwachsen der inneren Membranschicht, analog der Entwicklung der Mitochondrien. Bei den Mitochondrien wachsen diese „Tubuli“ mehr oder weniger senkrecht zur Oberfläche in das Stroma hinein, während sie bei den Proplastiden nach der Einfaltung abbiegen und knapp unter der Oberfläche entlang ziehen sollen. Gleichzeitig mit diesem Prozeß beginnt auch die Bildung der Stärkekörner. Da diese Stärkekörner aber nur im Plastidenstroma entstehen können, folgt Mühlethaler daraus, daß es sich bei den von ihm untersuchten Zellorganellen nur um Plastiden handeln könne. Bei guter Belichtung sollen nun diese einwachsenden Doppellamellen kontinuierlich vermehrt werden und sich zu Grana- und Stromalamellen entwickeln. Bei Lichtmangel hingegen unterbleibt zunächst (auch nach Hodge, McLean und Mercer) diese Lamellenbildung. Die einwachsenden Tubuli zerfallen in zahlreiche Bläschen, die sich zu einem sogenannten Prolamellarkörper zusammenordnen. Nach Belichtung dieser Proplastiden mit Prolamellarkörper beginnen sich nach Mühlethaler die Bläschen dieses Körpers zunächst zu strecken und dann zu Doppellamellen zu verschmelzen. Es sollen sich dabei zuerst die Grana bilden, die geldrollenartig übereinanderliegen und erst, wenn diese nahezu fertig ausgebildet sind, wachsen dazwischen die Stromalamellen ein. Eine identische Reduplikation der Grana konnte Mühlethaler nirgends feststellen. Sie entstehen nach ihm entweder durch seitliches Einwachsen der Plastidenmembran oder aus dem bei Verdunklung gebildeten Prolamellarkörper. Die zwischen den Granen liegenden Stromaschichten sollen sich von diesen nur durch ihre größere Flächenentwicklung unterscheiden. Nach Mühlethaler und Frey-Wyssling hängt also die innere Struktur der Proplastiden weitgehend von der Belichtung ab, und das soll auch der Grund dafür sein, daß sich die lichtmikroskopischen Befunde der verschiedenen Autoren so häufig widersprechen. Wie aber auch die Entwicklung vor sich gehen mag, am Beginn liegen stets Proplastiden mit lockerer Innenstruktur vor, die sich dann zu Jungchloroplasten mit durchgehend lamelliertem Stroma entwickeln.

Betrachten wir die vorliegenden Färbeergebnisse vom Standpunkt der Plastidenentwicklung aus, so sehen wir, daß am Beginn der Entwicklungsphase das noch nicht durchgehend lamellierte Stroma der Plastiden ebenso wie das Stroma der Epidermis-Leukoplasten mit Uranin fluorochromierbar ist. In den fertigen, funktionstüchtigen Chloroplasten der Teilungs- und Arbeitsphase hingegen ist das lamellierte Stroma nicht mehr sichtbar fluorochromierbar. Es färbt sich nur mehr eine zarte äußere Hülle, das Peristromium, an. Auch an Plastiden, in denen die Grana in der Fluoreszenz sehr deutlich zu sehen waren, wie z. B. bei *Aspidistra elatior* und *Chlorophytum comosum*, konnte im Stroma keine Grünfluoreszenz wahrgenommen werden. Es wäre allerdings auch möglich, daß die strahlende Rotfluoreszenz eine eventuell vorhandene schwache Grünfluoreszenz des zwischen den Granen liegenden Stromas überdecken würde. Allerdings haben sich auch blaßgrüne, kaum merklich rot fluoreszierende Plastiden nicht mehr mit Uranin fluorochromieren lassen. Es scheint also doch das lamellierte Plastidenstroma nicht mehr zur Uraninspeicherung befähigt zu sein, wogegen das locker strukturierte, noch nicht durchwegs lamellierte



Stroma der meist noch amöboiden Proplastiden und auch der Leukoplasten, ebenso wie das Protoplasma, mit Uranin fluorochromierbar ist. An den ergrünt, lamellierten Plastiden färbt sich nur mehr ein schmaler grüner Außensaum, der wohl dem Peristromium entspricht. Daß es sich bei diesem grünen Saum, der immer wieder zu sehen war, nicht um das umgebende Plasma handeln kann, war deutlich an den von der Plasmaströmung mitgeschleppten Plastiden von *Elodea* und *Vallisneria* zu sehen. Auch war in den Stengelparenchymzellen von *Tradescantia*, wo das Plasma kaum merklich oder gar nicht fluorochromiert ist, der grüne Saum um die Chloroplasten immer deutlich ausgebildet.

Auch erwachsene Chromoplasten färben sich mit Uranin nicht sichtbar an. Schon Schimper (1885) stellte fest, daß die gelben Pigmente der Chromoplasten an keine besonderen Strukturen gebunden sind, daß sie vielmehr als kristalline oder tröpfchenartige Einschlüsse auftreten. Dabei sind diese Tröpfchen meist peripher gelagert, so daß das Innere der Chromoplasten farblos erscheint. Verteilen sich die Tröpfchen regelmäßig an der ganzen Plastidenoberfläche, so erinnert das mikroskopische Bild stark an die Granastruktur der Chloroplasten.

Über die Entstehung der Chromoplasten liegen ebenfalls aus letzter Zeit licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen von Frey-Wyssling und Kreutzer (1958) vor. Die Chromoplasten der Honigblätter von *Ranunculus repens*-Blüten entstehen aus kleinen, blaßgrünen Chloroplasten, die Stärkekörner enthalten. Bei der Bildung der Chromoplasten nimmt die Stärke- und Chlorophyllmenge immer mehr ab, während sich das gelbe Pigment sehr rasch vermehrt. Die Carotinoide befinden sich in Kügelchen, die auf den ersten Blick wie Grana aussehen und von Frey-Wyssling als „Globuli“ bezeichnet werden. In den Perianthblättern der *Ranunculus*-Blüte hingegen entstehen die Chromoplasten direkt aus den farblosen Amyloplasten. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergaben, daß in den Honigblättern zunächst kleine Proplastiden vorhanden sind, die das übliche Lamellarsystem entfalten. Es entstehen zunächst Jungchloroplasten mit wenigen Granen; gleichzeitig erscheinen die ersten osmiophilen Globuli mit einem Durchmesser bis 150 Å. Der Bildungsort dieser Globuli liegt zwischen den Lamellen. Sie nehmen zahlenmäßig und auch an Größe ständig zu, wodurch die Lamellenstruktur nach und nach zerstört wird. Schließlich bricht, wie sich Frey-Wyssling ausdrückt, die ganze Innenstruktur zusammen. Übrig bleibt nur noch die Plastidenhaut, die den ganzen desorganisierten Plastideninhalt zusammenhält. Die Globuli, die keine Innenstruktur und spezifische Formgestaltung zeigen, ordnen sich dieser Außenmembran an und schließen eine zentrale Vakuole ein. Auf Grund seiner Versuchsergebnisse deutet Frey-Wyssling diese Chromoplastenbildung als eine Art Lipophaneroze (siehe auch Zurzycki 1954). Er hält die ausgebildeten Chromoplasten für degenerierte Plastiden mit völlig passiver Funktion und bezeichnet sie als alloplasmatische Organelle ohne eigenen Stoffwechsel.

Die großen Chromoplasten von *Reinwardtia indica*, deren Globuli regelmäßig über die ganze Oberfläche verteilt liegen und so an die Granastruktur der Chloroplasten erinnern, färben sich mit Uranin nicht sichtbar an, auch kein grüner Saum ist zu sehen. Sie stimmen allerdings nach Frey-Wyss-

lings Untersuchungen hinsichtlich ihrer Innenstruktur weder mit den Proplastiden noch mit den ergrüntten, lamellierten Chloroplasten überein. Bei den nach vakuoliger Degeneration der Chromoplasten sichtbar werdenden und mit Uranin fluorochromierbaren Blasen dürfte es sich wohl um die anschwellenden Innenvakuolen der Plastiden handeln. Die Blasen erscheinen als Ganzes, nicht nur an ihrer Oberfläche gefärbt.

Daß das Uranin aber noch ins Innere der bereits lamellierten und voll-ergrüntten Chloroplasten, deren Stroma nicht mehr sichtbar fluorochromierbar ist, eindringen kann, zeigt deutlich die Anfärbung der Assimilationsstärke, die ja in den Stromalagen zwischen den Lamellen entsteht (Strugger 1951). Die Assimilationsstärke war stets besonders auffallend und gleißend grün fluorochromiert. Diese Stärkefärbung kann so intensiv und strahlend sein, daß an Plastiden, die sehr viele und große Stärkekörner enthalten (vor allem an den Plastiden der Schließzellen), eine Gesamtplastidenfärbung vorgetäuscht wird (siehe Höfler, Ziegler, Luhan 1956, S. 333, 340, 341, 346). Die Färbung der Assimilationsstärke trat immer nur in lebenden Zellen auf. In toten Zellen, deren Plastiden ebensoviel Stärke enthielten, war niemals Stärkefluoreszenz zu sehen. Das grelle Aufleuchten der Stärke in den Plastiden ließ uns an eine Mitbeteiligung der Grenzschicht von Plastidensubstanz und Stärke denken (Höfler, Ziegler, Luhan 1956).

Auch Reservestärke (z. B. Kartoffelknolle oder Mark von *Houttuynia cordata*) färbt sich nur in lebenden Zellen. In angeschnittenen Randzellen des Schnittes und außerhalb des Schnittes in der umgebenden Flüssigkeit fanden sich jedoch immer wieder grün fluorochromierte Stärkekörner. Weiters wurde immer wieder beobachtet, daß fluorochromierte Assimilationsstärkekörner beim Abtöten der Zellen, ebenso wie das Protoplasma und die Zellkerne, ihre Fluoreszenz verlieren. Hier könnte es sich um eine fluoreszenzlöschende Wirkung des abgestorbenen Plasmas und der Plastiden handeln.

Angaben über Stärkefluorochromierung mit Fluoreszeinen liegen bereits zahlreich vor (Schumacher 1933, Döring 1933, Haitinger 1938, Eschrich 1953, Höfler, Ziegler, Luhan 1956, Enöckl 1959). Schumacher bezeichnete die Stärkefluorochromierung als sehr empfindlichen vitalen Stärkenachweis. Döring fand, daß die Stärke dann speichert, wenn auch das Plasma speichert. Auch bei meinen pH-Reihenversuchen zeigte sich, wie bereits erwähnt, meist Übereinstimmung von Plasma- und Stärkefluorochromierung. An Schnitten durch die Kartoffelknolle aber zeigte sich mehrmals, daß bei alkalischen pH-Stufen von pH 8,0 und 8,75, bei denen keine Plasma- und Kernfluorochromierung mehr auftrat, die Stärkekörner doch noch grün fluorochromiert waren, allerdings nicht mehr so intensiv wie in den tieferen pH-Stufen.

Döring sah, daß auch das Tetrabromfluoreszein = Eosin Stärkekörner lebender Zellen intensiv anfärbt, wogegen Stärkekörner in benachbarten toten Zellen nicht fluoreszieren. Die aus dem Schnitt herausgefallenen Stärkekörner verlieren nach Döring sehr bald ihre Fluoreszenz, wenn man die mit fluoreszierender Stärke gefüllten Zellen mechanisch zerstört und das Fluorochrom wegdiffundieren kann.

Wie weitere Versuche zeigten, färbt sich aber nicht nur die Assimilations- und Reservestärke in den Zellen; auch käufliche Stärke ist mit Uranin fluorochromierbar. Die Hauptversuchsreihe wurde mit käuflicher Kartoffelstärke durchgeführt, aber auch Weizen- und Marantastärke ließen sich mit Uranin zur Grünfluoreszenz bringen.

An der fluorochromierten Kartoffelstärke war der schalen- bzw. schichtenförmige Bau (Badenhuisen 1959) deutlich zu sehen. Die Färbung gelang im stark sauren und im stark alkalischen Medium. Sie blaßte nach einigen Stunden Aufenthalt im farblosen Puffer wieder aus.

Über Stärkefluorochromierung mit Akridinorange berichten Czaja (1956) und Bancher und Hölzl (1959). Mit dem basischen Akridinorange färben sich nach Bancher und Hölzl die Stärkekörner gelbrot, wobei die Schichtung sehr schön zu sehen ist. Dies läßt auf vorwiegend elektroadsorptive Speicherung des basischen Farbstoffes durch elektronegative saure Gruppen des Substrates schließen (Kinzel 1955, 1958). Es sind hier wohl die Phosphatgruppen des Amylopektins, die für die Speicherung in Frage kommen. Bancher und Hölzl schließen aus den Färbeargebnissen, daß in den weniger lichtbrechenden, wasserreichen und locker gebauten Schichten des Stärkekornes die verzweigten und vernetzten, mit stark hydrophilen, sauren Gruppen ausgestatteten Moleküle des Amylopektins überwiegen. Nach Badenhuisen (1959) soll aber der Schichtenbau, nicht wie Czaja (1954) meinte, allein auf chemischer Verschiedenheit der beiden Schichten beruhen, sondern vor allem auf ihrem unterschiedlichen Hydratationsgrad. Beide Schichten sollen unverzweigte und verzweigte Moleküle von Amylose und Amylopektin enthalten.

Bancher und Hölzl sahen weiters, daß bei Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  die Rotfluoreszenz der Stärkekörner ausblieb und daß statt der roten Schichtenfluoreszenz eine gleichmäßige grüne Fluoreszenz auftrat, die das Kennzeichen von Difluoreszenz aufwies. Auch mit den sauren Fluorochromen Thiazolgelb G und Primulin O konnten sie diffuse Fluorochromierung der Stärkekörner erzielen. Sie beruht ihrer Meinung nach auf Einlagerung der Farbstoffteilchen in den intermizellaren Hohlräumen (Inklusion, vgl. Kinzel 1955).

Auch die Färbung der Stärke mit dem sauren Fluorochrom Uranin kann nicht auf Elektroadsorption beruhen, doch färben sich hier ebenso wie mit dem basischen Akridinorange die Schichten verschieden stark an. Kräftig grün fluorochromierte Schichten wechseln mit dunklen, kaum mattgrün erscheinenden Schichten ab. Offenbar ist hier die verschiedenartige Anfärbung der Schichten durch ihren unterschiedlichen Hydratationsgrad bedingt. Das würde ja auch mit der Beobachtung im Einklang stehen, daß beim gequollenen Protoplasma gleichzeitig mit der erhöhten Hydratation auch eine erhöhte Bindekraft für Uranin auftritt.

Als wichtigstes Ergebnis der vorliegenden Studie ist wohl die Tatsache zu werten, daß sich an lebenden, noch locker strukturierten Proplastiden und Leukoplasten das Stroma, gleich wie das lebende Protoplasma, mit Uranin zu grüner Fluoreszenz bringen läßt. Desgleichen an den erwachsenen Proplastiden panaschierter Pflanzenteile, die ein oder mehrere große ergrünte Granen besitzen, deren Stroma aber nicht in der Weise lamelliert zu sein scheint, wie dies bei erwachsenen vollergrünenden Plastiden der Fall ist. Es

müssen also hier in bezug auf das Bindungsvermögen für Uranin die gleichen physiko-chemischen oder strukturellen Dispositionen bestehen wie im lebenden Protoplasma. Sie scheinen weiters auch im Peristromium der erwachsenen grünen und voll funktionstüchtigen Chloroplasten gegeben zu sein, das sich mit Uranin ebenfalls grün fluorochromieren läßt. — Anders verhält sich aber die lamellierte Hauptmasse der Chloroplasten. Sie konnte mit Uranin niemals zur Grünfluoreszenz gebracht werden. Die Chloroplasten dienen ja vor allem der photochemischen Wasserspaltung und der  $\text{CO}_2$ -Fixierung (Dunkelreaktion). Sie enthalten den zum gesamten Photosynthesevorgang bis auf das Niveau der Kohlehydrate nötigen Apparat und scheinen, wie die jüngste Entwicklung mehr und mehr erkennen läßt, weitgehende Selbständigkeit zu besitzen und auf keinerlei Mitwirkung anderer Zellteile angewiesen zu sein. Schon Ueda (1949) sprach von einer „Autonomie“ der Chloroplasten, für die Arnon die Ausdrücke „biochemical unit“ (1956) und „functional unit“ (1958, vgl. Kinzel 1959) prägte. Er kam auf Grund seiner Versuchsergebnisse an isoliertem und zertrümmertem Chloroplastenmaterial zu dem Schluß, daß die Dunkelreaktion von einem extrahierbaren Enzymsystem durchgeführt wird, das vielleicht im Stroma der Plastiden seinen Sitz hat, während die Lichtreaktion unbedingt an die für die Plastiden charakteristischen Strukturen gebunden ist. Den Hauptsitz der Lichtreaktion dürften dabei die Grana darstellen. Hier tritt die innige Verknüpfung von Struktur und Funktion, die ja im Bereich des Lebendigen so allgemein verbreitet ist, besonders augenfällig zu Tage. In diesem lamellierten Chloroplastenleib herrschen nun, seiner Funktion entsprechend, eben andere physiko-chemische und vor allem strukturelle Verhältnisse, die es mit sich bringen, daß er sich dem Uranin gegenüber nicht wie lebendes Plasma verhält.

#### D. Zusammenfassung

1. Erwachsene lebende Chloroplasten können mit Uranin nicht zur Fluoreszenz gebracht werden. Sie erscheinen auch nach stunden- und tagelanger Einwirkung des Uraninfarbbades im UV-Licht in ihrer roten Eigenfluoreszenz. Nur ein schmaler grüner Saum (Peristromium) ist um die Chloroplasten zu sehen. Er kann schmaler oder breiter, deutlich oder weniger deutlich sichtbar sein, wurde aber immer wieder beobachtet. Im lamellierten, voll funktionstüchtigen Chloroplastenleib scheinen in bezug auf das Bindungsvermögen für Uranin, seiner Funktion entsprechend, eben andere Voraussetzungen gegeben zu sein wie im lebenden Plasma.

2. Lebende Chloroplasten sind nur während ihrer frühen Entwicklungsphase, solange das Stroma noch locker strukturiert ist, mit Uranin sichtbar fluorochromierbar. Auch die Leukoplasten der Epidermiszellen färben sich mit Uranin zu grüner Fluoreszenz. Die Intensität dieser Fluoreszenz schwankt aber von Pflanze zu Pflanze. Auch das Stroma erwachsener Pro-

plastiden in panaschierten Pflanzenteilen ist mit Uranin grün fluorochromierbar.

3. Die Plastiden färben sich nur in dem pH-Bereich, in dem auch das Protoplasma zur Uraninspeicherung befähigt ist.

4. Bei der Umlagerung des Uranins vom Plasma zum Zellsaft verschwindet auch die Grünfluoreszenz der Plastiden.

5. Lebende intakte Chromoplasten sind mit Uranin ebenfalls nicht färbbar. Hier ist auch kein grüner Saum zu sehen. Nur die bei der vakuoligen Degeneration auftretenden Blasen erscheinen nach Uraninfärbung grün fluorochromiert.

6. Die Assimilationsstärke in den Plastiden lebender Zellen färbt sich mit Uranin zu leuchtend grüner Fluoreszenz. Das Uranin muß also auch in das nicht mehr sichtbar fluorochromierbare Chloroplastenstroma eindringen können. Das intensive Leuchten der autochthonen Stärke läßt an eine Mitbeteiligung der Grenzschicht von Plastidensubstanz und Stärke denken. Bei entsprechend großer Stärkemenge (z. B. in den Plastiden der Schließzellen) kann diese Färbung eine Allgemeinfärbung der Chloroplasten vortäuschen. Punkt 10 der Zusammenfassung von Höfler, Ziegler, L u h a n (1956) wäre dahingehend zu korrigieren.

Bei der Umlagerung des Uranins vom Plasma zum Zellsaft verschwindet auch die Stärkefluoreszenz.

7. Auch die Reservestärkekörner ebenso wie die käufliche Stärke färben sich mit Uranin zu grüner Fluoreszenz. An uraninfluorochromierter Kartoffelstärke ist die Schichtung besonders deutlich zu sehen. Maßgebend für diese ungleiche Anfärbung der Schichten dürfte ihr unterschiedlicher Hydrationsgrad sein.

8. Die Fluorochromierung der Assimilationsstärke in den Plastiden ist ebenfalls nur in dem pH-Bereich möglich, in dem auch Plasmafärbung stattfindet. Reservestärke hingegen färbt sich auch noch im alkalischen Milieu, in dem das Plasma nicht mehr fluorochromiert ist. Käufliche Kartoffelstärke war noch bei pH 11 fluorochromierbar.

#### Literatur

- Ar n o n, D. J., 1956: Phosphorus metabolism and photosynthesis. Annual review of Plant Physiology 7, 525.
- 1958: The chloroplast as a functional unit in photosynthesis. Vortrag gehalten am 2. IX. in der Sektion XI am IV. Internat. Kongreß für Biochemie in Wien.
- B a d e n h u i z e n, N. P., 1959: Chemistry and Biology of the Starch Granule. Protoplasmatologia Bd. II/B, 2 b d. Springer Wien.
- B a n c h e r, E., und J. H ö l z l, 1959: Beobachtungen zur Färbung und Fluorochromierung von Stärkekörnern der Kartoffel (*Solanum tuberosum*). Österr. bot. Ztschr. 106, 571.
- B i e b l, R., 1940: Einige zellphysiologische Untersuchungen an *Hookeria lucens* (L.) Sm. Österr. bot. Ztschr. 89, 300.

- Böing, J., 1956: Vitaluntersuchungen über die Kontinuität der Granastruktur in den Chloroplasten von *Helodea densa*. Protoplasma 45, 55.
- Czaja, A. T., 1954: Mikroskopischer Nachweis von Amylose und Amylopektin am Stärkekorn sowie zweier Typen von Stärkekörnern. Planta 43, 379.
- 1956: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über das Haftprotein bei Stärkekörnern. Protoplasma 46, 143.
- Döring, H., 1935: Versuche über die Aufnahme fluoreszierender Stoffe in lebende Pflanzenzellen. Ber. dtsh. bot. Ges. 53, 415.
- Drawert, H., 1941: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende Pflanzenzelle. III. Die Aufnahme saurer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora 35, 21.
- 1960: Fluorochromierungsstudien an lebenden und toten Pflanzenzellen mit Fluorescein. Ber. dtsh. bot. Ges. 73, 115.
- Düvel, D., 1954: Beiträge zur Kenntnis der Struktur und Entwicklung der Chloroplasten. Protoplasma 44, 239.
- Enöckl, F., 1959: Vitalitätsprüfung reifer und überreifer Zellen aus dem Fruchtfleisch von *Sorbus aria*. Protoplasma 51, 320.
- Uranin-Fluorochromierung von Allium-Zellen nach Vorbehandlung mit Ammonkarbonat. Protoplasma 52, 344.
- Eschrich, W., 1953: Beiträge zur Kenntnis der Wundsiebröhrenentwicklung bei *Impatiens Holstii*. Planta 43, 37.
- Fasse-Franzisket, U., 1955: Die Teilung der Proplastiden und Chloroplasten bei *Agapanthus umbellatus*. Protoplasma 45, 194.
- Frey-Wyssling, A. und K. Mühlethaler, 1949: Über den Feinbau der Chlorophyllkörner. Vjschr. Naturforsch. Ges. Zürich 94, 179.
- und E. Kreutzer, 1958: Die submikroskopische Entwicklung der Chromoplasten in den Blüten von *Ranunculus repens*. Planta 51, 104.
- Grave, G., 1955: Über die Entwicklung der Chloroplasten bei *Agapanthus umbellatus*. Protoplasma 44, 273.
- Haitinger, M., 1938: Fluoreszenzmikroskopie, ihre Anwendung in der Histologie und Chemie. Akad. Verl. Ges., Leipzig.
- Heitz, E., 1936: Untersuchungen über den Bau der Plastiden. I. Die gerichteten Chlorophyllscheiben der Chloroplasten. Planta 26, 134.
- 1954: Kristallgitterstruktur des Granums junger Chloroplasten von *Chlorophytum*. Exper. Cell Res. 7, 606.
- und R. Maly, 1953: Zur Frage der Herkunft der Grana. Z. Naturforsch. 8 b, 243.
- Hodge, A. J., J. D. McLean and F. V. Mercer, 1956: A possible mechanism for the morphogenesis of lamellar systems in plant cells. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. 2, 597.
- Höfler, K., A. Ziegler und M. Luhan, 1956: Fluorochromierungsstudien mit Uranin. Protoplasma 46, 321.
- Hölzl, J., und E. Bancher, 1959: Fluoreszenzmikroskopische Studien an der Kartoffelknolle II. Färbungen und Fluorochromierungen der Eiweißkristalle. Protoplasma 50, 303.
- Kaja, H., 1956: Untersuchungen über Struktur und Entwicklung der Leukoplasten in der Epidermis von *Chlorophytum comosum* (Thunb.) Bak. Protoplasma 47, 280.
- Kinzel, H., 1955: Zur Kausalfrage der Zellwandfluorochromierung mit Akridinorange. Protoplasma 45, 73.



- Kinzel, H., 1958: Metachromatische Eigenschaften basischer Vitalfarbstoffe. *Protoplasma* 50, 1.
- 1959: Biochemische Ergebnisse von pflanzenphysiologischer Bedeutung. *Protoplasma* 50, 644.
- Küster, E., 1937: Pathologie der Pflanzenzelle. II. Pathologie der Plastiden. *Protoplasma-Monographie* 13, Berlin.
- Leyon, W., 1954: The structure of chloroplasts. VI. The origin of the chloroplast laminae. *Exp. Cell Res.* 7, 609.
- Menke, W., 1959: Zur Entwicklungsgeschichte der Plastiden von *Oenothera hookeri* und Morphogenese der Chloroplastenstruktur. *Z. Naturforsch.* 14 b, 394.
- Moder, A., 1932: Beiträge zur protoplasmatischen Anatomie des *Helodea*-Blattes. *Protoplasma* 16, 1.
- Mühlethaler, K., 1956: Untersuchungen über die Struktur und Entwicklung der Proplastiden. *Protoplasma* 55, 264.
- 1957: Submikroskopische Morphologie. *Fortschritte der Botanik* 19, 38.
- 1959: Submikroskopische Morphologie. *Fortschritte der Botanik* 21, 46.
- und A. Frey-Wyssling, 1959: Entwicklung und Struktur der Proplastiden. *J. Biophysic. a. Biochem. Cytol.* 6, 507.
- Perner, S., 1956 a: Die ontogenetische Entwicklung des Chloroplasten von *Chlorophytum comosum* I. Die Persistenz des Primärgranums und seine fragliche Kristallgitterstruktur im Proplastid. *Z. Naturforsch.* 11 b, 560.
- 1956 b: Die ontogenetische Entwicklung des Chloroplasten von *Chlorophytum comosum* II. Das Verhalten der Proplastiden bei der Entwicklung zu Jungchloroplasten. *Z. Naturforsch.* 11 b, 567.
- Reuter, L., 1955: Protoplasmatische Anatomie. *Protoplasmatologia* Bd. XI/2. Springer: Wien.
- Schimper, A. F. W., 1885: Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Bot. Ztg.* 41, 105.
- 1885: Untersuchungen über die Chlorophyllkörner und die ihnen homologen Gebilde. *Jb. wiss. Bot.* 16, 1.
- Schumacher, W., 1933: Untersuchungen über die Wanderung des Fluoreszeins in den Siebröhren. *Jb. wiss. Bot.* 77, 685.
- Sitte, D., 1958: Die Ultrastruktur von Wurzelmeristemzellen der Erbse. *Protoplasma* 49, 447.
- Strugger, S., 1958: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Speicherung und Wanderung des Fluoreszeinkaliums in pflanzlichen Geweben. *Flora* 152, 253.
- 1950: Über den Bau der Proplastiden und Chloroplasten. *Naturwiss.* 37, 166.
- 1951: Die Strukturordnung im Chloroplasten. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 64, 69.
- 1953: Über die Struktur der Proplastiden. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 66, 439.
- 1954 a: Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis des primären Granums in den Proplastiden. *Naturwiss.* 41, 286.
- 1954 b: Die Proplastiden in den jungen Blättern von *Agapanthus umbellatus* l'Hérit. *Protoplasma* 43, 120.
- 1956: Elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Chloroplasten von *Chlorophytum comosum*. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 69, 177.
- 1957: Elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Proplastiden des Vegetationskegels von *Elodea densa*. *Protoplasma* 48, 360.

- Strugger, S., und M. Losada-Villasante, 1956: Die Plastiden in den albicaten Geweben der Blätter einer mediovariegaten Form von *Chlorophytum comosum*. *Protoplasma* 45, 540.
- und S. Perner, 1956: Beobachtungen zur Frage der ontogenetischen Entwicklung des somatischen Chloroplasten. *Protoplasma* 46, 711.
- Ueda, R., 1949: *Bot. Mag. (Tokyo)* 62, 731. (Zitiert nach H. Pirson, *Fortschritte der Botanik* 21, 269, 280.)
- Weber, F., 1923: Enzymatische Regulation der Spaltöffnungsbewegung. *Naturwiss.* 11, 309.
- Zurzycki, J., 1954: Studies on chromoplasts I. Morphological changes of plastids in the ripening fruit. *Act. Soc. Bot. Poloniae* 23, 161. (Polnisch mit englischer Zusammenfassung).

### Kurze Mitteilungen

## Observations on the Osmotic Value of the Sap of the Central Vacuole of Ovules

By

**Marian Ryzkowski**

Laboratory of Plant Physiology Jagiellonian University, Cracow

With 1 Text-Figure

(Received March 5, 1960)

Most investigations on endosperm so far have dealt with cytological and morphological problems, though in recent years the physiological and biochemical properties of this tissue have been attracting more and more attention (Bajer 1952, Bajer and Mole-Bajer 1954, Cutter and Wilson 1954, Rijven 1952, Scholander 1955, Wilson and Cutter 1952). It has been thought useful to investigate in detail the physico-chemical properties of the central vacuole sap, i.e. the fluid filling the central vacuole of ovules and the changes of these properties from a very early stage of ovule development till the moment when the growing endosperm tissue replaces the central vacuole so that the isolation of sap becomes impossible. First the osmotic value of endosperm sap and the changes of this value in the course of ovule growth were determined.

The osmotic value of the sap pressed slightly from ovules was measured by the thermoelectric method (Andel 1952, Hill 1930). The apparatus used consists of a thermocouple, a protecting moist chamber and a Kipp A 70-galvanometer. The moist chamber containing the thermocouple (manganin and constantan strips  $7\ \mu$  thick and 1 mm. wide) was immersed in a water bath, which was connected with an ultrathermostat, allowing measurements at a constant temperature of  $25^{\circ}$  (differences of temperature in the water bath were  $0.01^{\circ}$ ). For calibration of the thermocouple solutions of known concentrations of boric acid were used. During the measurements a drop of 0.075 M boric acid was placed on one loop of the thermocouple, and a drop of sap on the other. The accuracy of measurements was 0.025 M. The material in the experiments was mainly ovules of *Haemanthus Katharinae* grown in a hothouse. The age of ovules used, counted from the day the perianth wilted, was 4 to 44 days. On fixed material it was found that the ovules of four days contained nuclear endosperm attached to the nucellus

cells and that the ovules had a vacuole at their centre. The sap used in each experiment was taken from one ovule only except in the case of very young ovules where the amount of sap was too small and had to be collected from 2 to 3 ovules.

The measurements of growth of the ovules have shown that the ovules grow at first more vigorously in length than in breadth. The increase of breadth becomes more rapid in the final stages of development. As regards osmotic value there are four distinct stages in the development of ovules (Fig. 1).

The first stage lasts the 4<sup>th</sup> to the 13<sup>th</sup> day of development and is characterized by a rise of the osmotic value of central vacuole sap from 0.21 to

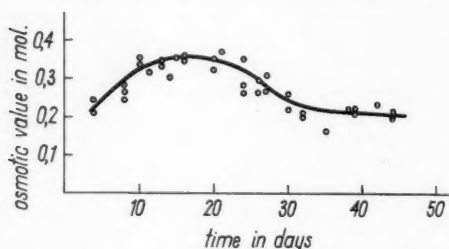


Fig. 1. The changes of the osmotic value in the sap of central vacuole in the ovules of *Haemanthus Katharinae*.

0.35 M. During that time the length and breadth of the ovules increased 2 mm. and 0.6 mm., respectively. The second stage lasts from the 13<sup>th</sup> to the 20<sup>th</sup> day. The growth of ovules is more rapid than in the previous stage (2.5 mm. in length and 1.7 mm. in breadth). The osmotic value of the sap remains constant. In the third stage lasting 15 days (from the 20<sup>th</sup> to the 35<sup>th</sup>) the ovules grow mainly in breadth.

The increase of length is 2.1 mm., the increase of breadth 2.3 mm. The osmotic value drops from 0.35 to 0.25 M. The fourth stage lasts from the 35<sup>th</sup> to the 44<sup>th</sup> day when the experiments were ended. In this stage there is already no growth in length but the

Table 1. The osmotic values (in M.) of the sap of the central vacuole in the ovules of different plant species.

Species	First Stage	Second Stage	Third Stage
<i>Asparagus officinalis</i>	0.203	0.311	0.195
	0.218	0.281	0.169
	0.300	0.443	0.366
<i>Clivia</i> sp.	0.311	0.456	0.381
	0.245	0.318	0.233
	0.233	0.293	0.225
<i>Haemanthus puniceus</i>	0.421	0.600	0.438
	0.391	0.596	0.394

breadth still increases. The osmotic value is almost constant with a downward trend from 0.23 to 0.21 M.

In the other experiments the osmotic value of the central vacuole sap of *Haemanthus puniceus*, *Asparagus officinalis*, *Clivia* sp. and *Leucojum aestivum* was also determined (Table 1). The relation between the growth

of the ovules and the osmotic value was found to be the same as in *H. Katharinae*.

Changes of the osmotic value in the central vacuole sap, the initial rise of the value to a constant level and its subsequent drop are probably the result of two antagonistic processes: (1) the transport to the ovules of nutritive substances (aminoacids, sugars) from the vegetative organs and (2) the synthesis of storage substances of low osmotic activity (proteins, polysaccharides) in the developing endosperm. During the first stage, when the osmotic value increases, the former process is dominant and consequently the amount of osmotically active substances in the sap increases. During the second stage there is an equilibrium between the transport of nutritive substances and their utilization for the synthesis of storage substances. Finally in the third stage the synthetic processes predominate and the amount of osmotically active substances in the sap decreases. This interpretation of the curve illustrating the changes of the osmotic value in central vacuole sap is supported by the results of many investigators (Baptist 1956, Koblet 1940, Scholander 1955), among others by the measurements of the viscosity and surface tension of central vacuole sap of *Haemanthus Katharinae* (Ryczkowski 1960).

#### Literatur

- Andel, O. M. v., 1952: Determination of the osmotic value of exudation sap by means of the thermo-electric method of Baldes and Johnson. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet.* 55, 40.
- Bajer, A., 1953: Endosperm a valuable material of experimental studies on mitosis in vivo. *Acta Soc. Bot. Pol.* 22, 475.
- and J. Mole-Bajer, 1954: Endosperm, material for study of the physiology of cell division. *Acta Soc. Bot. Pol.* 23, 63.
- Baptist, N. G., 1956:  $\gamma$ -Amino-butyric and other free amino-acids in the coconut. *Nature* 178, 1403.
- Cutter, V. M. Jr., and K. M. Wilson, 1954: Effect of coconut endosperm and other growth stimulants upon the development in vitro of embryos of *Cocos nucifera*. *Bot. Gaz.* 115, 234.
- Hill, A. V., 1930: A thermal method of measuring the vapour pressure of an aqueous solution. *Proc. Roy. Soc. London* 127, 9.
- Koblet, R., 1940: Untersuchungen über die stofflichen Veränderungen im wachsenden und reifenden Weizenkorn. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* 50, 99.
- Rijven, A. H. G. C., 1952: In vitro studies on the embryo of *Capsella bursa-pastoris*. *Acta Bot. Neerlandica* 1, 157.
- Ryczkowski, M., 1960: Investigations on viscosity and surface tension of the central vacuole sap in *Haemanthus Katharinae* Bak. ovule. *Bull. acad. Pol. Sci., ser. Biol.* 4, 149.
- Scholander, P. F., 1955: Hydrostatic pressure in coconuts. *Plant Physiol.* 30, 560.
- Wilson, K. S., and V. M. Cutter, Jr., 1952: The distribution of acid phosphatases during development of the fruit of *Cocos nucifera*. *Amer. J. Bot.* 39, 57.

# Viscosity of Central Vacuole Sap of Ovules

By

Marian Ryzkowski

Laboratory of Plant Physiology Jagiellonian University, Cracow

With 2 Figures

(Received March 3, 1960)

In the course of studies on the physico-chemical properties of central vacuole sap viscosity, specific gravity and surface tension were determined. As investigation material *Haemanthus Katharinae*, *Clivia* sp., *Crambe tatarica* and *Asparagus officinalis* ovules were used. In the preliminary experiments with *Haemanthus Katharinae* a modified Oswald viscosimeter was used. This method, however, permits the measurement only of the older ovules (15-34 days old) from which a greater quantity of sap could be obtained. For this reason in further experiments the Pekarek method was introduced (Pekarek 1930, 1931).

Table 1. The viscosity of the central vacuole sap in different stages of development as measured by the Pekarek method.

(Mean values obtained from 10 to 20 measurements.)

Species	Absolute Viscosity in cP		
	Young Ovules	Older Ovules	Fully developed Ovules
<i>Asparagus officinalis</i>	1.3558	1.0610	1.2869
<i>Crambe tatarica</i>	1.2912	1.0168	1.2439
<i>Haemanthus Katharinae</i>	1.3635	1.0239	1.2405

The measurement results for *Haemanthus Katharinae* and *Clivia* sp. are shown in Figs. 1 and 2. As can be seen from the curves the viscosity of central vacuole sap varies very distinctly with the age of the ovules. The highest values were obtained for very young ovules, a decrease of viscosity taking place in the further stages of ovule development followed by an increase of viscosity to a constant level (Table 1).

It may be supposed that the decrease of viscosity in the first stages of ovule growth is connected with the dilution and partial utilization of pro-



teins (R y c z k o w s k i 1960). The increase of viscosity in the further stages of development is accompanied by an increase of specific gravity and a decrease of surface tension. For instance for *Haemanthus Katharinae* the specific gravity increases from 1.02 to 1.03 and the surface tension decreases from 65 dyns/cm. to 45 dyns/cm. This may be explained by a transport to the ovules of such compounds as carbohydrates and aminoacids, and the synthesis of proteins in the central vacuole sap. This supposition is in accordance with the conclusions of other investigators (Baptist 1956,

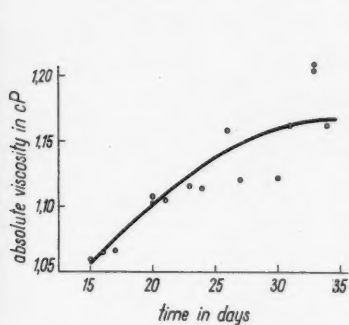


Fig. 1.

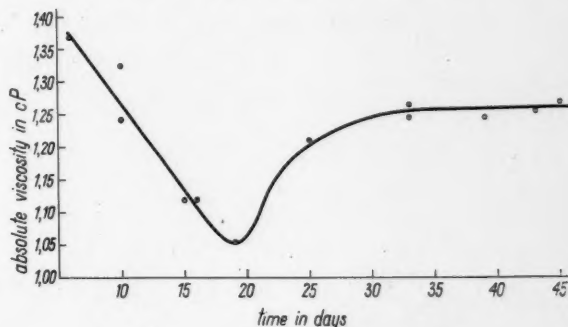


Fig. 2.

Fig. 1. The relation of the viscosity of central vacuole sap (determined by the viscometer method) and the age of ovules in *Haemanthus Katharinae* (after perianth wilted).

Fig. 2. The relation of the viscosity of central vacuole sap (determined by the Pekarek method) and the age of ovules in *Clivia* sp. (Mean values obtained from 10 to 20 measurements.) (after perianth dropped.)

Koblet 1940). E.g. Baptist (1956) showed by the chromatographic method that in nuts of *Cocos nucifera* the amount of aminoacids increases with age.

#### Literatur

- Baptist, N. G., 1956:  $\gamma$ -Amino-butyric and other free amino-acids in the coconut. Nature 178, 1403.
- Koblet, R., 1940: Untersuchungen über die stofflichen Veränderungen im wachsenden und reifenden Weizenkorn. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 50, 99.
- Pekarek, J., 1930: Absolute Viskositätsmessung mit Hilfe der Brownschen Molekularbewegung. Protoplasma 10, 510.
- 1931: Absolute Viskositätsmessungen mit Hilfe der Brownschen Molekularbewegung. Protoplasma 13, 637.
- Ryczkowski, M., 1960: Observations on the osmotic value of the central vacuole sap in *Haemanthus Katharinae* Bak. ovule. Bull. acad. Pol. Sci., ser. Biol. 4, 149.

### Sammelreferate

## Bericht über das Treffen der Biorheologen 1959 in Oxford (England)

Von

Hans H. Pfeiffer, Bremen

(Eingegangen am 11. Februar 1960)

1. Die Wissenschaft vom Fließen und der Formveränderlichkeit der Stoffe hat vor etwa 40 Jahren durch E. C. Bingham und H. Green in Amerika die Bezeichnung „Rheology“ (Fließkunde)<sup>1</sup> erhalten, und diese Bezeichnung ist inzwischen unter Berücksichtigung der sprachgesetzlich bedingten Abänderungen in eine beachtliche Zahl europäischer Sprachen übergegangen. Heute durchdringt die Rheologie bereits weite Felder der Technik auf den Gebieten der Anstriche, der Reibungs- und Schmierungsvorgänge, der Metallverformungen und Dehnungen aller Art und vielen anderen und hat sich zu einem eigenen Zweig angewandter Physik entwickelt, welcher von Vereinigungen, wie der Deutschen Rheologen-Vereinigung, der Deutschen Rheologischen Gesellschaft, der Groupe Français d'Études de Rhéologie, der British Society of Rheology (mit einer Sektion in Australien), der American Society of Rheology, der Rheologischen Gesellschaft der Niederlande, der Sektion Rheologie des Schwedischen Nationalkomitees für Mechanik, einer rheologischen Arbeitsgruppe der Japanischen Chemischen Gesellschaft und manchen anderen, intensiv gepflegt wird. So kann es nicht wundernehmen, daß sich auch die Biologie nicht mehr mit so vagen Beschreibungen des Protoplasmas wie bei F. Dujardin, H. v. Mohl und ihren Zeitgenossen („lebende Gallerte“, „klebrige Substanz“, „viskose Masse“ usw.) genug sein läßt. Auch an biologischen Objekten treten ja rheologische Probleme überall da auf, wo Bewegungen an den Systemen der Organismen und in und an biologischen Flüssigkeiten aller Art vorkommen. Keineswegs unterschätzt werden dürfen zwar die Schwierigkeiten, welche wegen der übergroßen Zahl von Variablen bei den so höchst komplexen Prozessen an Organismen und organismischen Flüssigkeiten entstehen und eine mathematische Erfassung von Versuchs- und Messungsbefunden erschweren. Als Folge dieser Situation besteht die Behandlung der Probleme durch den Biorheologen oft nur erst in bloßer Deskription beobachteter

<sup>1</sup> Abgeleitet vom Griech.  $\rho\acute{\epsilon}\omega$  = flow, aber gebraucht in dem weiteren Sinne von Deformation von Materialien.

Fakten oder in dem Versuch theoretischer Betrachtungen, die dann zu meist komplizierten mathematischen Ausdrücken führen und experimenteller Prüfung unterworfen werden müssen. Nachdem nun — vor allem seit dem ersten internationalen Colloquium „On Rheological Problems in Biology“, abgehalten im Juli 1950 in Lund (Schweden) [22], und seit den internationalen Rheologen-Kongressen in Oxford 1953 [24], [26] und Bad Oynhausen 1958 [23], wobei es auch schon zu einer losen Arbeitsgemeinschaft kam — rheologische Arbeitsweisen auf vielen Gebieten der Human- und Veterinärmedizin, der Protoplasmatik und Cytologie, der Physiologie von Mensch, Tier und Pflanze vorzudringen beginnen [29], schien es an der Zeit, gemeinsame Arbeitsziele durch ein Treffen von Biorheologen zu bekräftigen. So kam es am 23. und 24. September 1959 zu einem Symposium über „Flow Properties of Blood and Other Biological Systems“, das gemeinsam von der British Society of Rheology und dem Colloid and Biophysics Committee der Faraday Society ausgerichtet wurde und erneut das Anliegen biorheologischer Forschung als Ausbau jener neuen Querverbindung so differenter Ausgangsdisziplinen durch Anwenden rheologischer Methoden und Begriffe verdeutlichte. Einen großen Teil des Erfolges der Veranstaltung ist dem Leiter der örtlichen Organisation, D. R. G. McFarlane, zu danken. Welche bunte Vielfalt der Probleme selbst bei einer Beschränkung auf Blut und andere Flüssigkeiten der Organismen zu bearbeiten ist, zeigte auch dieses Symposium, über dessen Verlauf hier in Kürze berichtet werden mag (vgl. auch [25] und [27]).

2. Nach Eröffnungsansprache und Begrüßung durch P. R. Allison-Oxford erläuterte Lodge-Manchester [13] an konzentrierten Lösungen von Polymeren die grundlegenden Methoden der Rheologie, indem er vor kurzen Andeutungen der andern Eigenschaften vor allem Fragen der Elastizität, der Spannung entlang Stromlinien beim Fließen und Besonderheiten des Fließens in Kapillaren behandelte und den Einfluß der Konzentrationsunterschiede erörterte und das Zustandekommen des Weissenberg-Effekts ([28], S. 514 f.) demonstrierte. Von den beiden Harkness-London [9] wurde an Ratten in  $O_2$ -durchströmten Locke-Lösungen meist bei  $37^\circ C$  die plastische Anpassung des Kollagengewebes, besonders der Wandungen des Uterushalses zum Durchlassen des Fötus, durch Bestimmung von Dehnungs-Spannungskurven bei schneller bzw. verzögerter Belastung (Min. bzw. Std.) untersucht und dabei das Gesamt-Kollagen aus dem Hydroprolingehalt eines Gewebehydrolysats mit  $6N-HCl$  abgeschätzt. Sodann legte Scott Blair [17] Messungen der je zwei elastischen und Viskositätsparameter beim Koagulieren von Milch vor. Solche Koagulate verhalten sich danach bei einer Modifikation der Apparatur von P. R. Saunders und A. G. Ward ([24], S. 284) wie Burgerssche visko-elastische Körper ([28], S. 472 f.). Durch Gibbons und Glover [8] wurden gereinigte Gele des Mukoids vom Uterushals zu verschiedenen Stadien des Sexualzyklus in Mischungen 9:1 aus gesättigter  $CaCl_2$ -Lösung und Äthanol dispergiert und teils durch künstliche Kapillaren, teils im Couette zwischen konzentrischen Zylindern zum Fließen gebracht. Die anomalen Kurven der Strömungsdoppelbrechung während der Trächtigkeit wurden mit dem Zusammenwirken positiver Formdoppelbrechung und wechselnd positiver bzw. negativer Eigendoppelbrechung gedeutet, wobei die Eigenanisotropie eine Funktion des Ausdrucks  $1 + \beta^2$  mit  $\beta$  als Funktion der

Zellrate ist. Die Formdoppelbrechung soll weniger von der Schergeschwindigkeit abhängen als die Eigendoppelbrechung und entgegen H. Copie (J. Chem. Phys. 26, 1382, 1957) bei einem Achsenverhältnis der Leptonen  $= 4$  ihr Maximum erreichen. Durch Beller-Tübingen [3] wurde zu Viskositätsmessungen am Mukoid des menschlichen Uterushalses während des Menstruationszyklus das Consistometer Scott Blairs (Brit. Vet. J. 111, 3, 1955) benutzt und der Einfluß des Hormonspiegels durch Gaben von Östronsulfat, Östrogen, Gestagen, Östradiol und Östrol untersucht und die Anwendung zu einer Frühdiagnose der Schwangerschaft geprüft. Untersuchungen von Schleim und Mukoprotein der Bronchien durch White und Elmes-London [20] betrafen die Mikroskopie, die Orientation der Leptonen nach Färben säurefixierter Proben mit Toluidinblau und Prüfung auf UV-Dichroismus (s. auch Rheologica Acta 1, 96, 1958), die Rheologie nach Homogenisieren mit gleichem Volumen Wasser oder 0,14 mol oder mol NaCl in Ostwalds Viskometer, die Berücksichtigung klinischer Besonderheiten, die chemische Aufbereitung von Mukoproteiden nach dem Verfahren von Curtain und Pye (Austral. J. exp. Biol. Med. Sci. 33, 315, 1955) und Angaben über Viskosität und Elektronenmikroskopie von Mukoprotein. Auf einen weiteren Bericht über Beeinflussungen der Viskosität durch Hyaluronsäure und Hyaluronidase aus der Gruppe der Mukopolysaccharide durch Rogers [16] sei hier nur eben hingewiesen.

Mit Darlegungen der Rheologie des Skelettmuskels begann dann Bendall-Cambridge [4] eine neue Serie von Mitteilungen, wobei Adenosintriphosphat als Steigerer der Plastizität ebenso wie als Energiequelle gewertet und unter Heranziehung von Elektronenmikrogrammen durch Hanson und Huxley ein Bauplanmodell des Skelettmuskels der Mammalia entwickelt wurde, welches die Untersuchungsbefunde einschließlich der Reduktion der Extensibilität während der Starre einleuchtend deutet. Über Messungen der Zähigkeit (nach der Methode R. M. Loves) der Muskeln und des Muskelbreies von Fischen nach einer japanischen Methode berichtete Connell-Aberdeen [6]. Wegen des Vorkommens bindegewebiger Myocommata zwischen sich kontrahierenden Myotomen sind nur indirekte Bestimmungen möglich. Der Elastizitätsmodul frischer Schalenbündel, der mit  $1,5 \times 10^6$  dynes/cm<sup>2</sup> wohl zu niedrig ist, wächst sehr viel schneller als die Zähigkeit des Fischfleisches. Wie Heilbrunn-Philadelphia [11] ausführte<sup>2</sup>, sind die bevorzugten Methoden rheologischer Forschung am Protoplasma Gravitations- und Zentrifugierungsversuche unter Anwendung des Stokesschen Gesetzes und Messungen mit Hilfe der Brownschen Teilchenbewegung unter Benutzung der Einsteinschen Formel. Weitere Methoden seien aber für meine Bearbeitung des Themas für die „Protoplasmatologia“ [29] zurückgestellt. Im einzelnen wurde gezeigt, wie sehr die vitale Aktivität von bestimmten rheologischen

<sup>2</sup> Tief zu beklagen ist, daß dieses für den verdienten Mitbegründer der internationalen Zeitschrift „Protoplasma“ und der Serie der „Protoplasma-Monographien“ und Autor einer ganzen Reihe einschlägiger Bücher und vieler wissenschaftlicher Arbeiten, so auch eines wertvollen Beitrages zum Handbuch „Protoplasmatologia“ ein „Schwanengesang“ wurde, da er bald nach seiner Heimkehr durch einen tödlichen Autounfall zu Tode kam. In unauslöschlicher Erinnerung an die gemeinsam verlebten Tage im Trinity College in Oxford seien ihm diese Seiten gewidmet.

Wandlungen des polymeren Mischkolloids in Mitose, Anästhesie, Muskelkontraktion, Enzymeffekten usw. abhängt, aber auch welche Differenzen im Vergleich mit reinen Proteinen oder gegenüber nekrotisierendem Protosplasma vorkommen. Mittels Fließversuchen im Horizontal-Kapillarrisviskosimeter wie hauptsächlich im Couette zwischen konzentrischen Zylindern untersuchten Butler und Robins-London [5] das rheologische Verhalten von DNS-Lösungen in 0,2 mol NaCl. Wo die beiderlei Versuche sich überschneiden, fanden sie völlige Übereinstimmung der Ergebnisse beider. Sie bestimmten die von Volumen und Form der gelösten Molekeln abhängige Eigenviskosität und die anomale Beherrschung der Viskosität von der Schergeschwindigkeit und teilten erste Angaben über das Rigiditätsellipsoid, das Aufwinden der Molekeln mit gehemmtem Fließen, die Entstehung wurmförmiger Ketten und den Rotationsdiffusionskoeffizienten mit. Das Zusammenwirken von Deformation und Orientation beim Fließen erlaubt zwar eigentlich nur qualitative Aussagen, ermöglicht aber die Ermittlung von Unterschieden von DNS-Proben verschiedener Herkunft.

3. Die noch verbleibenden „hämorheologischen“ Beiträge der Konferenz wurden durch eine umfassende lecture über die Rheologie des Blutes durch Bayliss-London [2] eingeleitet. Er unterschied die Rheologie der Blutflüssigkeit und des Koagulats, behandelte das Fließen durch Kapillaren mit asymptotischem Abfall der scheinbaren Viskosität als des Quotienten aus aufgewandtem Druck und Fließgeschwindigkeit und interpretierte Versuche in Termen dreier Phänomene, nämlich des Zusammenhaltens suspendierter Leptonen, des Wandeffektes und der Achsenannäherung, obschon die drei noch nicht genügen, wie Versuche mit künstlichen Kapillaren belegen. Mit den Fließgeschwindigkeiten des Blutplasmas und der Erythrocyten beschäftigte sich sodann Whitmore [21]. Danach ist die Mächtigkeit der Schicht des langsamer als die roten Zellen bewegten Plasmarandes von der Fließgeschwindigkeit abhängig. Messungen der Transitgeschwindigkeit wurden mittels Injektion von Farbstoffen oder radioaktiven Trägern angestellt, und es wurde ein non-streamline behaviour festgestellt, welches durch die Komplikation der Blutgefäße und der rhythmischen Veränderungen ihres Lumens hervorgerufen werden dürfte, da der Effekt mit künstlichen Kapillaren ausbleibt. Die Mitteilung von McDonald-London [14], vornehmlich gestützt auf Forschungen des verstorbenen J. R. Womersley und jener von M. G. Taylor (Phys. Med. Biol. 3, 277, 1959), handelte die Hydrodynamik des Pulsationsfließens bei der Blutzirkulation in elastischen Kapillaren ab und setzte Fließschwingungen während des Herzzyklus voraus. Die Annahme laminaren Fließens in den großen Arterien dürfte schwer zu rechtfertigen sein (vgl. auch McDonald und Taylor, Progr. in Biophysics 9, 105, 1959). Der Bericht von Copley-London [7] geht von Befunden mit Scott Blair und teilweise anderen Mitarbeitern (vgl. Rheologica Acta 1, 170, 1958; Kolloid-Z. 1960, im Druck) über anomales Fließen, d. i. Nicht-Linearität der Kurve von Schergeschwindigkeit gegen Druck in künstlichen Kapillaren mit feinen Fibrinüberzügen der Innenwand, aus; ein linearer Verlauf dieser Funktion läßt sich erst mit der von Scott Blair (Nature, London, 183, 613, 1959) vorgeschlagenen Gleichung von N. Casson (in C. C. Mill, Rheology of Disperse Systems, London 1959) erhalten. Ferner wurde das

Adhärenzen roter Zellen an den Kapillarwänden verschieden behandelte Gläser geprüft. Druckwirkungen in lebenden mikroskopischen Gefäßen waren dagegen der Gegenstand des Berichts von Baez-New York [1]. Dabei wurde die Bedeutung des Gefäßtonus für Hydrodynamik und -rheologie gebührend herausgestellt und am Ratten-Mesococcus Wanddicke und Lumen arterieller und venöser Kapillaren bei bestimmt veränderten Drücken ermittelt. Die Turbulenz beim Fließen des Blutes durch Aderverzweigungen und an Stellen plötzlicher Lumenveränderungen behandelte Stehbens-Oxford [19] unter Verwendung von fünf Glasmodellen als Analoga der Cerebralarterien. Ref. [15] steuerte eine Mitteilung über Messungen des Rheo-Dichroismus mittels mikrospektrophotometrischer Methoden an Blutplasma von Meerschweinchen in künstlichen Kapillaren bei. Die quantitativen Befunde wurden mit vorübergehender Orientierung der Leptonen zu „cybotaktischen Gruppen“ und dabei induzierter optischer Anisotropie gedeutet. Die hämolysierten Membranen von Erythrocyten wurden von Katchalsky-Rehovoth/Israel [12] rheologisch mit Fußballblasen verglichen und als Kelvin-Körper ([28], S. 463) charakterisiert und der Elastizitätsmodul zu  $10^7$  bis  $10^8$  dyn/cm bestimmt. Sie lassen sich leicht deformieren und werden dadurch resistent gegen Druckschäden beim Passieren der Kapillaren. Sehr unterhaltsame und dabei rheologisch bemerkenswerte Demonstrationen mit diversen Substanzen und stofflichen Zuständen bot im Anschluß hieran K. Weissenberg-London, und nachdem dann Scott Blair [18] Blutkoagulate aus Blut der Hals- und der Anticubitalvene (Mensch, Kuh) im Vergleich mit Koagulat der Milch [17] betrachtet und als Maxwellsche Körper [28], S. 465, 516) charakterisiert hatte, wurde durch Hartert-Heidelberg [10] der Thrombelastograph zum Registrieren der Vorgänge bei der Blutkoagulation in seiner Wirkungsweise vorgeführt, mit welchem in wenigen Sekunden die Scherelastizität des Thrombus vom Augenblick der Entstehung der ersten Fibrinsträhne bis zur vollen Ausbildung oder von da bis zu völliger Fibrinolyse gemessen werden kann, worauf aus photokymographischen Kurven sogleich Koagulationszeit, Geschwindigkeit der Koagulatbildung und partielle und totale Fibrinolyse entnommen werden können (Grenzen der Methode werden beachtet). Die Retraktion des Thrombus beginnt zum Unterschied von methodisch fehlerhaften Angaben der Literatur sofort.

4. Ergänzt wurden die Mitteilungen durch eine Reihe von Demonstrationen, durch welche Apparaturen und Ergebnisse zur Bestimmung der Wandadhäsion in Blutgefäßen (Copley und R. S. Thorley), der Strömungsdoppelbrechung biologischer Systeme und der Messung der Schleimkonsistenz (Glover), der Entzündung bei der Kaninchenohr-Technik (L. Grant, A. G. Sanders und H. W. Florey), der Elastizität und Retraktion von Blutthromben (Hartert, R. G. MacFarlane), zu Weissenbergs Rheogoniometer und zur Apparatur zum Studium rheologischer Veränderungen an Blut und Milch (Scott Blair) in dafür angesetzter Zeit eingehend studiert werden konnten. Schließlich war eine Abendsitzung der Vorführung wissenschaftlicher Filme gewidmet, welche neueste Aufnahmen aus dem laufenden Jahre von dem Blutfluß in der Kaninchen-Aorta (McDonald), der Anordnung zum Stu-



dium der Lymphgefäße in Shoks (Baez), neuen Arbeiten an geschlammtem Blut (M. H. Knisely - Charleston), hämorrheologischen Methoden bei der Koagulation und zum Nachweis beim Fließen von Blutplasma an den Aderwänden (Copley, Scott Blair und weitere Mitarbeiter) darboten, noch ergänzt durch wenig ältere Filme über das Fließen in Stromlinien in Venen (McDonald und E. P. W. Helps) und in der Basilararterie (McDonald und J. M. Potter).

5. So hat auch die Oxforder Konferenz, deren sämtliche Mitteilungen demnächst auch ungekürzt in Druck erscheinen werden [30], wiederum, und das trotz einer gewissen stofflichen Einengung und Spezialisierung des Arbeitsgebietes, im Vergleich mit der Veranstaltung in Lund 1950 deutlich gezeigt, welcher Vielfalt von Problemen sich die Biorheologie gegenübersteht. Daß dennoch die Gefahr unzureichenden gegenseitigen Verstehens in den Diskussionen erfolgreich überwunden werden konnte, hat gewiß seinen Grund in dem gemeinsamen Bemühen aller Berichtersteller und Diskussionssprecher, sich in der Aussprache durch Angleichen in der Terminologie allen Teilnehmern verständlich zu machen, d. h. sich der gegebenen rheologischen Begriffswelt zu bedienen. Es wurde ein großer Erfolg auch über den eigentlichen Zweck einer Förderung der Biorheologie hinaus; denn auch der persönliche Gedankenaustausch war überaus reger, und einzelne Redner, die bisher Bekannte gewesen waren, schieden hernach als Freunde.

Obgleich wir heute nur erst in den Anfängen stehen, hat sich bei der Aussprache ferner erneut ergeben, wie fruchtbar die verhandelte Querverbindung zwischen den einzelnen biologisch-medizinischen Arbeitsfeldern und der Rheologie bereits gewesen ist und weiter zu werden verspricht. Dieses überraschende Faktum scheint auf zwei in diesem Jahrhundert immer wieder in der Forschung hervorgetretenen wissenschaftlichen Prinzipien zu beruhen, nämlich der Bearbeitung von Grenzgebieten zwischen bisher einander fernstehenden wissenschaftlichen Disziplinen und der Einführung einer spezifischen Versuchsmethodik, im vorliegenden Falle des Fließ- oder allgemein des Deformationsexperiments. Beide für die Fruchtbarkeit neuer wissenschaftlicher Arbeitsrichtungen so bedeutsamen Prinzipien sind die Grundlage für die Erarbeitung einer Biorheologie [29] und eröffnen ihr ein Arbeitsfeld von einer ungewöhnlich umfangreichen Weite, welches auch durch zu erhoffende künftige biorheologische Konferenzen nicht so bald ausgeschöpft werden kann. Daß dieses Gebiet teilweise auch von eminent praktischer Bedeutung und Anwendbarkeit werden könnte, sei dabei nur ganz am Rande bemerkt, hat aber auch bereits das Oxforder Treffen mehrfach bewiesen.

#### Literatur

##### a) Konferenzberichte

- [1] Baez, S.: Pressure experiments in living microscopical vessels.
- [2] Bayliss, L. E.: The rheology of blood.
- [3] Beller, F. K.: Consistency of human cervical mucus and its dependence on hormonal factors.
- [4] Bendall, J. R.: The stretch deformation of skeletal muscle.

- [5] Butler, J. A. V., and A. B. Robins: The flow properties of DNA solutions.
- [6] Connell, J. J.: Mechanical properties of fish and fish products.
- [7] Copley, A. L.: Apparent viscosity and wall adherence of blood systems.
- [8] Gibbons, R. A., and F. A. Glover: Flow birefringence of a purified cervical mucoid.
- [9] Harkness, M. L. R., and R. D. Harkness: Physical properties of connective tissue of reproductive tract in relation to pregnancy.
- [10] Hartert, H.: Thrombelasticity: Physical and physiological aspects.
- [11] Heilbrunn, L. V.: Rheology of protoplasm.
- [12] Katchalsky, A.: The rheology of the membrane of red blood cells.
- [13] Lodge, A. S.: Rheological properties of concentrated polymer solutions.
- [14] McDonald, D. A.: Velocity profiles and pulsatile blood flow.
- [15] Pfeiffer, H. H.: Some measurements of rheo-dichroism of Guinea-pig blood plasma.
- [16] Rogers, H. J.: Hyaluronic acid and hyaluronidase.
- [17] Scott Blair, G. W.: Coagulation of milk.
- [18] — Rheology of blood coagula.
- [19] Stehbens, W. E.: Turbulence of blood flow in the vascular system of man.
- [20] White, J. C., and P. C. Elmes: Some rheological properties of bronchial mucus and mucoprotein.
- [21] Whitmore, R. L.: A theoretical treatment of the differential flow velocities of plasma and corpuscles in living bodies.

#### b) Andere zitierte Mitteilungen

- [22] Frey-Wyssling, A., 1952: Report on the 1st international colloquium On Rheological Problems in Biology. In: A. Frey-Wyssling, Deformation and flow in biological systems, 481—516. North Holland Publ. Co.: Amsterdam.
- [23] Fritz, W., H. Jung, H. Kroepelin, W. Meskat, H. H. Pfeiffer, M. Pfendler, H. Schlichting und F. Schultz-Grunow: Verhandlungen des Dritten Internationalen Rheologie-Kongresses. *Rheologica Acta* 1, (seit 1958).
- [24] Harrison, V. G. W., 1954: Proceedings of the Second International Congress on Rheology, 64—70, 373—394. London (Butterworth).
- [25] Pfeiffer, H. H., 1960: Biorheologische Diskussion zu „Flow Properties of Blood and Other Biological Systems“. *Ber. D. Rheolog. Ges.* 18, 23—24.
- [26] Scott Blair, G. W., 1933: Second international congress on rheology. *Nature* (London) 172, 487.
- [27] — 1959: Flow properties of biological systems. *Nature* (London) 184, 1539—1540.
- [28] Reiner, M., 1958: Rheology. In: S. Flügge, *Handb. d. Physik* 6, 434—550. Springer: Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- [29] Pfeiffer, H. H.: Fadenziehen und Rheologie des Protoplasmas. *Protoplasmatologia II C 3*, in Vorbereitung. Springer: Wien.
- [30] Copley, A. L., and G. Stainsby, 1960: Proceedings of the Joint Meeting On Flow Properties of Biological Systems, in press. Pergamon Press: Oxford-London-New York-Paris.

# Neuere Erkenntnisse über Energiewechsel und Makromolekülsynthese der Zelle<sup>1</sup>

Versuch einer elementaren Darstellung

Von

**Helmut Kinzel**

Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Wien

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Februar 1960)

## I. Einleitung und Fragestellung

Es ist den Physiologen schon seit langer Zeit klar, daß mit den chemischen Reaktionen, die in jeder lebenden Zelle dauernd vor sich gehen, untrennbar auch energetische Umsetzungen verknüpft sind. Einerseits ist dies eine Eigenheit aller Reaktionen, wie die physikalische Chemie lehrt, andererseits weiß man von den Organismen im besonderen, daß sie zu energetischen Leistungen mannigfacher Art fähig sind: Sie können Wärme abgeben, Muskularbeit leisten und sie können viele komplizierte chemische Verbindungen aufbauen, die einen hohen Gehalt an chemischer Energie besitzen, was sich in einer großen Verbrennungswärme ausdrückt.

Da nach dem ersten Hauptsatz der Wärmelehre keine Energie aus dem Nichts entstehen kann, so müssen die Organismen, ja muß jede lebende Zelle über eine Energiequelle verfügen. Die Physiologie lehrt, daß diese Energiequelle die Atmung bzw. die Gärung ist. Welcher Art ist nun die Energie, die die Zelle aus diesen Vorgängen bezieht? In den Lehrbüchern der Physiologie findet man Gleichungen für die Atmung und Gärung, in denen Wärmemengen aufscheinen:



Es handelt sich also um exotherme Abbauvorgänge, bei denen Wärme frei werden kann.

<sup>1</sup> Nach einem Vortrage, gehalten am 15. Dezember 1959 vor der botanischen Sektion und der Sektion zur Förderung des biologischen Unterrichtes der zoologisch-botanischen Gesellschaft Wien.

Der biologische Sinn einer solchen Energieproduktion besteht natürlich darin, daß in der Zelle ja ständig auch Aufbau-Reaktionen und andere Vorgänge ablaufen müssen, die einer Energiezufuhr bedürfen. Wir fragen nun: Ist die Energieform der Wärme, die in den oben angeschriebenen Gleichungen als Produkt der Atmung und Gärung aufscheint, hierfür zweckmäßig? Wohl lassen sich endotherme Reaktionen in gewissen Fällen durch eine starke Temperaturerhöhung in Gang bringen, doch kommt dieser Weg für Organismen nicht in Frage, weil ja, wie bekannt, die makromolekularen Substanzen (z. B. Proteine) bei den erforderlichen hohen Temperaturen nicht existenzfähig sind. Man könnte ferner auch daran denken, daß die Organismen zu Energieumwandlungen befähigt seien, wie solche etwa in unseren Wärmekraftmaschinen stattfinden. Hier lehrt die physikalische Chemie, daß zwar die verschiedenen Energiearten (elektrische Energie, mechanische Energie und dgl.) beliebig ineinander umwandelbar sind, daß aber die Wärme eine Sonderstellung einnimmt: Zwar lassen sich alle anderen Energiearten in beliebigem Ausmaß in Wärme verwandeln, der umgekehrte Weg (Umwandlung von Wärme in andere Energieformen) ist jedoch nach dem zweiten Hauptsatz der Wärmelehre nur in beschränktem Umfang möglich und vor allem an die Bedingung gebunden, daß ein Temperaturgefälle verfügbar ist. Die Wärmekraftmaschinen besitzen ein solches Temperaturgefälle, das sie zu ihren Leistungen befähigt. Die lebenden Organismen besitzen in sehr vielen Fällen überhaupt kein Temperaturgefälle, aber auch in den Fällen, da ein solches vorhanden ist (wie etwa bei den warmblütigen Tieren), verfügen die Organismen über keine Vorrichtungen, die sie dazu befähigen, dieses Gefälle in nennenswertem Umfang auszunützen. Wir können so auf Grund der physikochemischen Voraussetzungen nicht damit rechnen, daß Wärme eine wesentliche Energiequelle für irgendwelche Organismen ist. Im Gegenteil: Wir dürfen annehmen, daß eine Energiemenge, die in einem Organismus in Form von Wärme entsteht, für den Organismus verlorengeht, weil sie in kürzerer oder längerer Zeit an die Umgebung abgegeben wird. Daraus ergibt sich die Folgerung, daß die oben angegebenen Gleichungen, in denen der Energiegewinn bei der Atmung und der Gärung in Form einer Wärmemenge aufscheint, dem biologischen Sinn dieser Vorgänge nicht gerecht werden. Wir müssen also nach einem besseren Verständnis des Energiewechsels der Organismen suchen.

## II. Einige Grundzüge chemischer Reaktionen

Es ist an dieser Stelle nötig, etwas weiter auszuholen und über einige grundsätzliche Eigentümlichkeiten chemischer Reaktionen zu sprechen. Betrachten wir eine Verbindung, die im Stoffwechsel vieler Organismen eine große Rolle spielt: das Glucose-6-Phosphat, abgekürzt Gl-6-Ph (Abb. 1).

Diese Verbindung könnte sich (theoretisch) aus Glucose und Phosphorsäure bilden:  $\text{Glucose} + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{Gl-6-Ph} + \text{H}_2\text{O}$ . Freilich, wenn man die beiden Komponenten in wässriger Lösung zusammenmischt, entsteht kein Glucose-6-Phosphat. Es wäre nun sehr naheliegend, zu der Meinung zu kommen: wenn ein Organismus, wenn eine Zelle diesen Stoff braucht, dann werden sie eben ein Enzym besitzen, das die oben angeschriebene Reaktion in Gang bringt! Hier muß gleich mit aller Deutlichkeit gesagt werden: Es gibt kein solches Enzym, es kann keines geben, wie bald gezeigt werden

wird. Wohl gibt es ein Enzym, das die umgekehrte Reaktion veranlaßt, also die Spaltung des Gl-6-Ph zu Glucose und Phosphorsäure.

Wir müssen uns, um diese Tatsache zu verstehen, mit dem Begriff der Freiwilligkeit eines Naturvorganges befassen, der uns nicht nur im chemischen, sondern auch im physikalischen Bereich entgegentritt: Vorgänge, die nach einer bestimmten Richtung freiwillig ablaufen, können in der entgegengesetzten Richtung nur durch Zufuhr von Energie erzwungen werden. Wasser fließt freiwillig nur bergab. Soll es bergauf transportiert werden, dann ist es notwendig, eine Pumpe einzusetzen, also Arbeit (Energie) in den Vorgang hineinzustecken. Die Arbeit, die man aus dem herabfließenden Wasser gewinnen kann (Wasserkraftwerk!), ist, wenn man von den Reibungsverlusten absieht, genau so groß wie die Arbeit, die man aufwenden müßte, um das Wasser nachher wieder zur gleichen Höhe empor zu pumpen. Diese Überlegungen gelten auch für chemische Reaktionen. Auch diese gehen (unter gegebenen Konzentrationsverhältnissen) freiwillig nur nach einer Richtung. Nach der anderen Richtung können sie nur durch Energiezufuhr erzwungen werden.

Die oben genannte Reaktion verläuft nun in der Richtung der Spaltung von Glucose-6-Phosphat freiwillig („bergab“), in der Richtung der Synthese hingegen „bergauf“, sie müßte hier durch Energiezufuhr erzwungen werden. Nun verstehen wir, warum es kein Enzym geben kann, das den Aufbau von Gl-6-Ph veranlaßt: Ein Enzym kann nicht Energie aus dem Nichts erzeugen. Das würde dem ersten Hauptsatz der Wärmelehre widersprechen. Die Funktion der Enzyme liegt vielmehr — wie bekannt — auf dem Gebiet der Katalyse. Sie haben also die Aufgabe, Reaktionen, die zwar grundsätzlich freiwillig ablaufen, aber durch irgendwelche Umstände (Molekülbau oder dgl.) gehemmt sind, in Gang zu bringen. Mit einem Vergleich läßt sich dies etwa so ausdrücken: wenn ein Wagen auf einer geneigten Straße steht, dann sollte man erwarten, daß er bergab zu rollen beginnt. Es kann aber sein, daß er trotzdem stehenbleibt, nämlich dann, wenn seine Achsen so verschmutzt und verrostet sind, daß eine Drehung der Räder zu sehr erschwert ist. Jedermann weiß, was in einem solchen Falle zu tun ist: man muß die Achsen mit einem Schmiermittel behandeln, dann wird sich der Wagen in der erwarteten Richtung in Gang setzen. Kein vernünftiger Mensch aber wird erwarten, daß man einen Wagen mit Hilfe eines Schmiermittels dazu veranlassen kann, bergauf zu fahren. Dazu ist ein Treibstoff, also Energiezufuhr, nötig. Nun dürfen wir den Satz aussprechen, daß die Enzyme die „Schmiermittel“ des Stoffwechsels sind. Seine Treibstoffe gehören einer anderen Klasse von Verbindungen an. Hiervon soll weiter unten die Rede sein.

Man hat zur Kennzeichnung einer freiwillig („bergab“) verlaufenden Reaktion das Wort „exergon“ geprägt. Im Gegensatz dazu ist eine „endergone“ Reaktion eine solche, die freiwillig nicht stattfindet, sondern erst durch Energiezufuhr erzwungen werden könnte. Diese Begriffe sind wohl zu unterscheiden von der Wärmetönung einer chemischen Reaktion. Bekanntlich nennt man exotherm alle Reaktionen, bei denen Wärme frei wird, endotherm diejenigen, bei denen Wärme aufgenom-

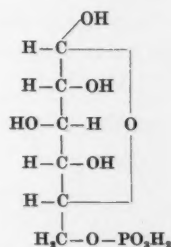
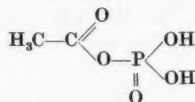


Abb. 1. Glucose-6-Phosphat.

men wird. In der Frühzeit der physikalischen Chemie war man der Meinung, daß alle exothermen Reaktionen auch freiwillig ablaufen. Obwohl dies die Regel ist, hat man doch seither genug Beispiele für freiwillig verlaufende Reaktionen, die unter Wärmeaufnahme vor sich gehen, kennen gelernt. Man hat daher den Begriff der Freiwilligkeit von dem der Wärmetönung getrennt und kann nun sagen, daß zwar die meisten Reaktionen, die exergon sind, auch exotherm verlaufen, daß es aber sehr wohl auch exergone und endotherme Reaktionen gibt. Die wichtigste Folgerung dieses Kapitels sei nochmals wiederholt: Ein Enzym kann nur eine exergone Reaktion, die aus irgendeinem Grund gehemmt ist, in Gang bringen, nicht aber eine endergone Reaktion erzwingen, weil dazu Energiezufuhr nötig wäre.

### III. Die „Treibstoffe“ des Stoffwechsels

Im Jahre 1941 machte F. Lipmann darauf aufmerksam, daß bei einigen organischen Phosphorsäureverbindungen, z. B. solchen, die den Charakter von Säureanhydriden haben, die Bereitschaft zum Verlust eines Moleküls Phosphorsäure bedeutend größer ist als bei Phosphorsäure-Estern. Es handelt es sich um Verbindungen vom Typ des Acetylphosphates



oder, um gleich auf den wichtigsten Vertreter dieser Gruppe zu kommen, um Verbindungen, in denen sich mehrere Moleküle Phosphorsäure aneinander hängen, wie dies z. B. beim Adenosintriphosphat der Fall ist. Dieses besteht, wie die Formel (Abb. 2) zeigt, aus einem Molekül der Purinbase Adenin, einem Molekül Ribose und drei Molekülen Phosphorsäure. Die Verbindung wird meist in der abgekürzten Form ATP geschrieben. Durch hydrolytische Abspaltung eines Moleküls Phosphorsäure unter dem Einfluß des Enzymes Adenosintriphosphatase entsteht daraus das Adenosindiphosphat (ADP):  $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{H}_3\text{PO}_4$ .

Die Reaktion verläuft freiwillig („bergab“) in der angegebenen Richtung. Lipmann stellte nun fest, daß die Bereitschaft zu dieser Reaktion (und übrigens auch zur Abspaltung des zweiten Phosphatrestes) bedeutend größer ist als die Bereitschaft zur Spaltung eines Phosphorsäure-Esters, wie z. B. des Glucose-6-Phosphates (vgl. S. 671). Es gibt also im Grade der Freiwilligkeit verschiedener Reaktionen Unterschiede, so wie etwa Wasser mit größerem oder geringerem Gefälle bergab fließen kann. Analoge Feststellungen haben schon vor langer Zeit zur Aufstellung eines Maßes für die Triebkraft einer chemischen Reaktion geführt. Man nennt dieses Maß die „freie Energie“ (oder, genauer, die „freie Enthalpie“<sup>2</sup>) einer chemischen Reaktion und bezeichnet sie mit dem Symbol  $\Delta G$ . (Wie das

<sup>2</sup> Enthalpie nennt man in der physikalischen Chemie eine Energiemenge, die gemessen wird, während der energieliefernde Vorgang unter konstantem Druck abläuft, und in der also die Ausdehnungs- bzw. Kontraktionsarbeit bei der mit vielen Reaktionen verbundenen Volumenänderung berücksichtigt ist.



Symbol  $\Delta$  andeutet, handelt es sich eigentlich um die Differenz zwischen der freien Enthalpie des Anfangszustandes und der des Endzustandes.)

$\Delta G$  wird in Kalorien/Mol gemessen, darf jedoch wiederum nicht etwa mit der Wärmetönung einer Reaktion verwechselt werden, die man mit dem Symbol  $\Delta H$  bezeichnet. Der Zahlenwert von  $\Delta G$  gibt vielmehr an, wie groß unter bestimmten Umständen die Tendenz ist, daß eine Reaktion in einer bestimmten Richtung abläuft<sup>3</sup>. Man ist dabei zu der Übereinkunft gekommen, die  $\Delta G$ -Werte für alle exergonen (also freiwilligen) Reaktionen mit negativen Vorzeichen, für alle endergonen Reaktionen mit positiven Vorzeichen anzuschreiben.

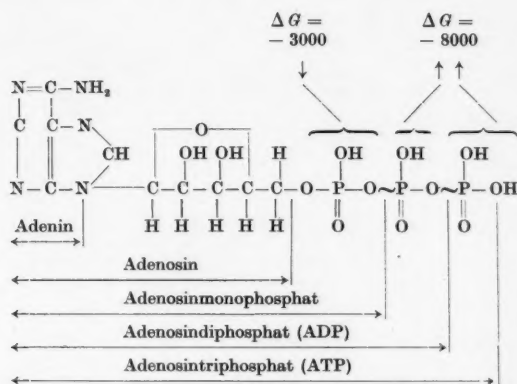


Abb. 2. Das Adenosintriphosphat und seine Abbauprodukte. Die sogenannten „energiereichen Bindungen“, deren hydrolytische Spaltung mit stark negativen  $\Delta G$ -Werten verläuft, pflegt man mit dem Zeichen  $\sim$  darzustellen.

Da die  $\Delta G$ -Werte stark von den Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer abhängen (was bei der Wärmetönung  $\Delta H$  nicht der Fall ist), so muß man, um vergleichbare Werte zu erhalten, die Bedingungen angeben, für welche ein bestimmter  $\Delta G$ -Wert bestimmt oder errechnet wurde. Im allgemeinen pflegt man  $\Delta G$  für den Fall zu berechnen, daß die Konzentrationen der Anfangs- und Endprodukte gleich groß sind, d. h. für den Fall einer zur Hälfte abgelaufenen Reaktion. (Die im folgenden angeführten Zahlenwerte von  $\Delta G$  beziehen sich alle auf diesen Fall, und zwar in der Regel für  $C = 1$  Mol/l.)

$\Delta G$  ist in gewisser Hinsicht nur eine veränderte Ausdrucksform des Massenwirkungsgesetzes. Dieses besagt ja bekanntlich, daß eine chemische Reaktion so lange in einer bestimmten Richtung weiterläuft, bis ein Gleichgewichtszustand

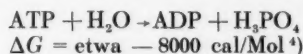
<sup>3</sup> Exakter ausgedrückt, bedeutet  $\Delta G$  die maximale Arbeit, die eine Reaktion zu leisten imstande ist, wenn unter gegebenen Konzentrationsverhältnissen 1 Mol umgesetzt wird. Es sei noch erwähnt, daß  $\Delta G$  mit  $\Delta H$  verknüpft ist durch die Beziehung  $\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$ , wobei  $S$  eine Größe bedeutet, die man Entropie nennt und die ein Maß für die Wahrscheinlichkeit eines Zustandes darstellt. Bezüglich weiterer Einzelheiten vergleiche man die Lehrbücher der physikalischen Chemie.

zwischen der mit der Zeit immer langsamer verlaufenden Hinreaktion und der immer rascher verlaufenden Rückreaktion erreicht ist. Dieser Gleichgewichtszustand kann, je nach der Art der Reaktion, dann erreicht sein, wenn Ausgangs- und Endprodukt in gleichen Konzentrationen vorliegen, er kann aber auch mehr oder weniger stark nach der Richtung der Endprodukte oder auch nach der Richtung der Ausgangsprodukte verschoben sein. Die Bezeichnungen Ausgangs- oder Endprodukt sind natürlich relativ: es kommt darauf an, nach welcher Richtung man die Reaktionsgleichung anschreibt. Der Zusammenhang mit  $\Delta G$  ist leicht herzustellen: es wurde oben gesagt, daß man  $\Delta G$  meist für den Fall angibt, daß in der Lösung gleich viel Ausgangs- und Endprodukt vorhanden ist. Ist das System in diesem Zustand im Gleichgewicht, dann ist  $\Delta G = 0$ , d. h. das System zeigt keine Tendenz, nach irgendeiner Seite weiter zu reagieren. Liegt das nach dem Massenwirkungsgesetz zu erwartende Gleichgewicht aber auf der Seite der Endprodukte, wie z. B. bei der Reaktion  $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{H}_3\text{PO}_4$ , dann hat  $\Delta G$  im oben angegebenen Zustand (gleich viel Anfangs- und Endprodukt) einen Zahlenwert mit negativem Vorzeichen (und zwar etwa  $-8000 \text{ cal/Mol}$ ), d. h. die Reaktion hat die Tendenz, in der durch die Reaktionsgleichung angegebenen Richtung weiterzulaufen. Je mehr sich dadurch die Konzentrationsverhältnisse dem Gleichgewichtszustand nähern, desto geringer wird die Tendenz zu noch weiterer Reaktion, um schließlich im Zustand des Gleichgewichtes ganz zu verschwinden. Dementsprechend müssen wir für  $\Delta G$ , das zuerst einen hohen negativen Zahlenwert hatte, immer niedrigere negative Zahlenwerte anschreiben, bis  $\Delta G$  im Gleichgewicht natürlich  $= 0$  wird.

Schreiben wir die Gleichung verkehrt an, also in der Form:  $\text{ADP} + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$ , so ändern wir dadurch an der Natur der Dinge nichts. Das System hat weiterhin die Neigung, sich dem Zustand zu nähern, in dem viel  $\text{ADP} + \text{H}_3\text{PO}_4$  und wenig  $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$  vorliegt. Da wir aber nun  $\text{ADP}$  und  $\text{H}_3\text{PO}_4$  formal zu den Ausgangsprodukten der Reaktion ernannt haben, so müssen wir sagen, daß das Gleichgewicht nun auf der Seite der Ausgangsprodukte liegt. Zu ihrer Bildung hin ginge also die Reaktion „bergab“, nach der anderen Seite, die wir in unserer neuen Gleichung durch den Pfeil angegeben haben, geht sie „bergauf“. Sie könnte so nur durch Energiezufuhr erzwungen werden.  $\Delta G$  hat daher einen positiven Zahlenwert, und zwar für den Fall, daß gleich viel Ausgangs- und Endprodukt vorhanden ist, den Wert von  $+8000 \text{ cal/Mol}$ . Wenn wir einen solchen Wert von  $\Delta G$  sehen, dann wissen wir nun, daß die Reaktion nicht freiwillig nach der angegebenen Richtung verlaufen kann, wohl aber mit der Triebkraft  $-8000 \text{ cal/Mol}$  nach der entgegengesetzten Richtung.

Es wird im folgenden deutlich werden, daß dieses ganze Begriffssystem, das zunächst wie eine sophistische Spielerei anmutet, eine große praktische Bedeutung für das Verständnis des Energiwechsels der Zelle hat. Wir müssen uns aber bei seiner Benützung stets vor Augen halten, daß vieles davon auf Übereinkunft beruht und daß wir hier nicht die Ursachen für die beschriebenen Geschehnisse vor uns haben, sondern Maßzahlen für Begriffe, die wir aus der Natur abstrahiert haben. Wer sich über dieses Gebiet näher zu informieren wünscht, findet recht brauchbare knappe Darstellungen bei Haurowitz (1959) und Klotz (1957), eine ausführliche Behandlung bei Netter (1959) und in den Lehrbüchern der physikalischen Chemie.

Wir können nun versuchen, etwas tiefer einzudringen in das Verständnis der Verbindungen, die wir vorhin „Treibstoffe des Stoffwechsels“ genannt haben. Wir schreiben nochmals die Reaktion an:



Die Reaktion ist also stark exergon (und exotherm,  $\Delta H = -4800 \text{ cal/Mol}$ ). Die Tendenz zu einem Ablauf in der angegebenen Richtung ist also sehr groß, die Gleichgewichtskonzentration an unzersetztem ATP ist nach Beendigung der Reaktion unmeßbar klein. Die eingangs erwähnte Reaktion  $\text{Glucose-6-Phosphat} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Glucose} + \text{H}_3\text{PO}_4$  geht nicht so stark „bergab“.  $\Delta G$  beträgt (für 1-molare Lösung)  $-3000 \text{ cal/Mol}$ . Da bei vielen Stoffwechselvorgängen, z. B. bei der alkoholischen Gärung, das Glucose-6-Phosphat eine bedeutsame Rolle spielt, so muß es in den betreffenden Zellen eine Möglichkeit zu seiner Synthese geben. Nun sind wir aber schon weiter oben auf die Tatsache gestoßen, daß kein Enzym die ziemlich stark endergone Reaktion  $\text{Glucose} + \text{Phosphat} \rightarrow \text{Glucose-6-Phosphat} + \text{H}_2\text{O}$  ( $\Delta G = +3000 \text{ cal/Mol}$ ) zu erzwingen vermag, weil ein Katalysator nicht Energie produzieren kann. Der Schlüssel zur Lösung dieses Problems liegt bei der Möglichkeit einer sogenannten „energetischen Koppelung“. Das heißt, formal gesprochen: die Zelle kann eine endergone Reaktion dadurch in Gang bringen, daß sie sie mit einer gleichzeitig ablaufenden exergonen Reaktion koppelt. In bildlicher Form ausgedrückt, entspräche dieser Vorgang etwa dem Betrieb der sogenannten Standseilbahnen, bei denen ein Wagen mittels eines Seiles, das in der Bergstation über eine Rolle läuft, durch das Gewicht eines talwärts fahrenden Wagens hochgezogen wird. In chemischen Gleichungen ausgedrückt, würde die Synthese von Glucose-6-Phosphat so aussehen:



Die Gesamtreaktion ist also exergon, sie führt „bergab“. Diese Reaktion kann also von einem Enzym katalysiert werden und tatsächlich findet so die Biosynthese von Glucose-6-Phosphat statt. Das Enzym, das auf diese Reaktion spezialisiert ist, heißt Hexokinase. Es spielt bei der alkoholischen Gärung eine große Rolle und wurde auch schon kristallisiert dargestellt. (Vgl. Haehn 1952, Baldwin 1957, Lehnartz 1959.)

Die oben in chemischen Gleichungen dargestellte „energetische Koppelung“ ist allerdings nur ein formales Schema. Tatsächlich laufen nicht der Zerfall von ATP und die Synthese von Gl.-6-Ph. nebeneinander her, sondern die Reaktion vollzieht sich nach der Summengleichung, d. h. der Phosphatrest geht vom ATP direkt auf die Glucose über. Wenn nämlich ein Phosphatmolekül, das bei der Spaltung von ATP entsteht, sich frei in der Lösung befindet, dann unterscheidet es sich in nichts von jedem beliebigen anderen Phosphatmolekül und ist also auch zu keiner Reaktion mit Glucose befähigt. Die bei der ATP-Spaltung auftretende Energie wird in diesem Falle in Form von Wärme frei und geht verloren. Für den direkten Übergang des Phosphatrestes von ATP auf Glucose ist die Anwesenheit eines Moleküls des Enzyms Hexokinase notwendig. Die katalytische Wirkung

<sup>4</sup> Die angeführten thermodynamischen Daten sind, wenn nicht anders vermerkt, aus den zusammenfassenden Darstellungen von Haurowitz (1959) und Holzer (1956) entnommen oder nach dort angegebenen Daten umgerechnet worden.

der verschiedenen Enzyme beruht darauf, daß die Enzymmoleküle jeweils befähigt sind, die bei der betreffenden Reaktion beteiligten Moleküle kurzfristig an sich zu binden. Dabei werden die Reaktionspartner infolge der spezifischen Eigenschaften des Enzymmoleküls in eine besonders günstige räumliche Lage zueinander gebracht, die die Verlagerung von Bindungen oder den Übergang von Atomgruppen von einem Reaktionspartner auf den anderen erleichtert. Abb. 3 soll grob schematisch andeuten, wie der Übergang des Phosphates von ATP auf Glucose während der Bindung der Reaktionspartner an das Enzymmolekül stattfinden könnte, ohne daß das Phosphat dabei frei wird.

Der Zellstoffwechsel umgeht also eine endergone Reaktion dadurch, daß er einen Reaktionspartner (in diesem Falle das Phosphat) vorher auf ein höheres Niveau hebt und als sogenanntes „energiereiches Phosphat“ in Form von ATP in die Reaktion einführt. Dadurch wird die ursprünglich endergone Reaktion in eine exergone verwandelt, die von einem Enzym in Gang gebracht werden kann.

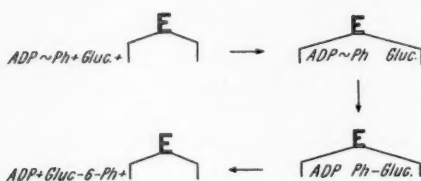


Abb. 3. Möglicher Reaktionsmechanismus für die Phosphorylierung der Glucose. Ph = Phosphat,  $ADP + Ph$  = Adenosintriphosphat. Der Buchstabe E mit den dachförmigen Linien soll das Enzym-Molekül symbolisieren.

spezifische Funktionen im Stoffwechsel, aber das ATP ist die weitaus wichtigste dieser Verbindungen.

#### IV. Die Produktion von energiereichen Verbindungen

Dem Leser wird nicht verborgen geblieben sein, daß die Frage nach der Art des Zustandekommens endogener Reaktionen in der Zelle mit den bisherigen Ausführungen nur um einen Schritt hinausgeschoben, aber nicht endgültig beantwortet ist. Die „Phosphorylierung“ der Glucose und viele andere ähnliche Reaktionen werden dadurch in Gang gebracht, daß energiereiches Phosphat eingesetzt wird. Wie entsteht aber dieses energiereiche Phosphat in der Zelle? Wir können heute darauf eine eindeutige Antwort geben: Die Produktion von energiereichen Verbindungen ist die eigentliche Funktion der Atmung und der Gärung.

Es gibt innerhalb der langen Reaktionskette dieser Abbauvorgänge eine Reihe von Einzelschritten, die so stark exergon sind, daß sie mit der Synthese von ATP aus ADP und Phosphat „gekoppelt“ werden können. Eine dieser Reaktionen z. B. ist die Dehydrogenierung von Glycerinaldehyd zu Glycerinsäure, ein wichtiger Schritt beim Abbau der Kohlehydrate. Will man die beiden „gekoppelten“ Reaktionen formal voneinander getrennt

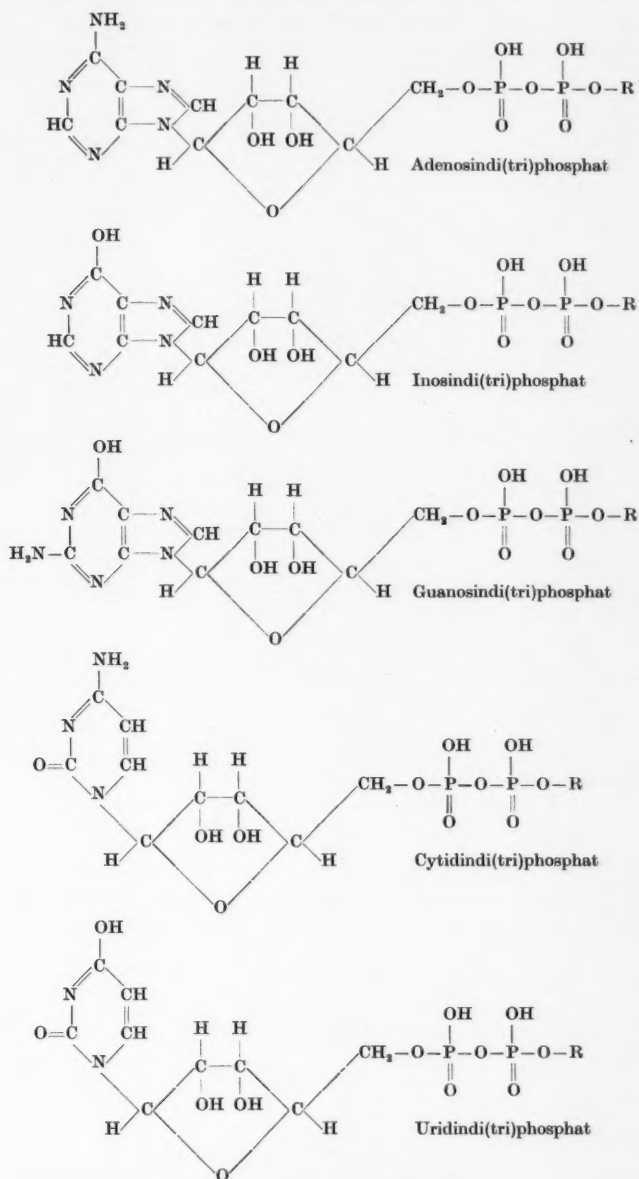
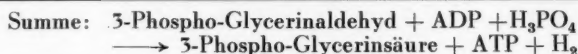
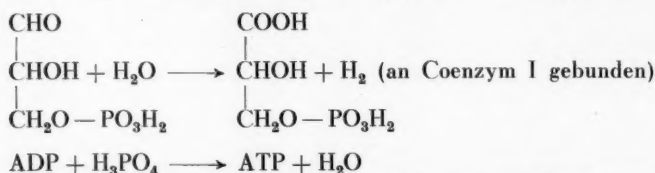


Abb. 4. Die energiereichen Phosphatverbindungen. R = H : Diphosphate, R =  $\text{PO}_3\text{H}_2$  : Triphosphate.

aufschreiben, so müssen die Gleichungen so aussehen (die genannten Verbindungen reagieren bekanntlich in phosphorylierter Form):



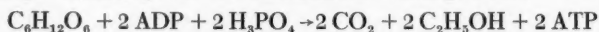
In Wirklichkeit sind die beiden Reaktionen innig miteinander verwoben und finden während der Bindung an Enzymmoleküle statt, analog dem in Abb. 3 dargestellten Vorgang. Die gesamte Reaktion benötigt 2 verschiedene Enzyme und ein Coenzym (zur Aufnahme des Wasserstoffes). Zunächst wird, gleichzeitig mit dem Entzug des Wasserstoffes, das Phosphat an die dabei neu entstehende COOH-Gruppe gebunden und dann durch das zweite Enzym von dort auf das ADP übertragen. (Bezüglich der Einzelheiten des Reaktionsmechanismus vgl. z. B. Dixon und Webb 1958, S. 586.) Ohne die „Koppelung“ mit der ATP-Synthese wäre die Dehydrogenierung von Glycerinaldehyd stark exergon ( $\Delta G$  etwa  $-11.000 \text{ cal/Mol}$ ). Bei gleichzeitig ablaufender ATP-Synthese ( $\Delta G$  etwa  $+8000$ ) verläuft sie immer noch exergon ( $\Delta G = -3000$ ), so daß ihr flüssiger Ablauf gesichert ist.

Auf ähnliche Weise wird auch bei anderen Teilschritten der Atmung energiereiches Phosphat gewonnen, so vor allem bei der Oxydation des Wasserstoffes, der bei den verschiedenen Dehydrogenierungsreaktionen den Substraten entzogen und über eine Reihe von Coenzymen und Enzymen dem Sauerstoff der Luft entgegengeführt wird. Der Mechanismus dieser ATP-Synthese ist allerdings noch nicht ganz geklärt. Man kann aber nach den experimentellen Ergebnissen schließen, daß bei der vollständigen Oxydation eines Moleküls Glucose etwa 38 Moleküle ATP aus ADP und Phosphat produziert werden. Der eigentliche Energiegewinn bei der Atmung ist also dieses ATP, das der Zelle dann für ihre Aufbaureaktionen zur Verfügung steht. Das ATP und seine Verwandten treten an zahlreichen Stellen des Stoffwechsels in Aktion. Besonders wichtig ist ihre Beteiligung bei der Synthese der Makromoleküle, die im nächsten Abschnitt besprochen werden soll.

Die Gleichung für die Atmung kann nun in richtiger Form angeschrieben werden:



Die analoge Gleichung für die alkoholische Gärung lautet:



Aus diesen Gleichungen läßt sich ablesen, welchen Gewinn die Zelle von den genannten Vorgängen hat. Es wird also ein gewisser Anteil der beim Kohlehydrat-Abbau umgesetzten Energie in Form energiereicher Verbindungen abgefangen. Der Rest wird in Form von Wärme frei und geht durch Ableitung an die Umwelt verloren.



## V. Die Bedeutung der energiereichen Phosphatverbindungen für die Synthese der Makromoleküle

Ein charakteristisches Merkmal aller Lebewesen ist die Beteiligung von Makromolekülen am Aufbau ihrer Zellen. Nucleinsäuren und Proteine fehlen keiner Zelle, Polysaccharide sind weitverbreitet. Über die chemische Konstitution dieser Verbindungen wissen wir bereits manches, die Wege ihres Aufbaues waren lange Zeit hindurch in Dunkel gehüllt. Wohl schien es schon vor Jahrzehnten klar, daß sie durch Zusammenfügung ihrer Bausteine, der Nucleotide, der Aminosäuren, der Monosaccharide, entstehen müßten, aber es war nicht möglich, aus der Zelle Enzyme zu isolieren, die einen solchen Aufbau auch *in vitro* durchführen. Wohl kannte man schon seit dem vorigen Jahrhundert Enzyme, die Makromoleküle abzubauen vermögen: die eiweißspaltenden Verdauungsfermente wie Pepsin und Trypsin oder die stärkespaltende Amylase („Diastase“) des Malzes. Trotz eifrigen Suchens gelang es aber nicht, Enzyme zu finden, die in einigermaßen befriedigender Ausbeute die umgekehrten Reaktionen katalysieren. Erst die physikochemische Betrachtungsweise brachte eine Klärung des Sachverhaltes: Die hydrolytische Spaltung der Makromoleküle ist (in wässriger Lösung) stets exergon, die direkte Synthese aus den Bausteinen daher endergon. Es kann daher kein Enzym geben, das die direkte Aufbaureaktion katalysiert. Der Syntheseweg in der Zelle verläuft über einen Umweg. Die folgenden Beispiele sollen einige dieser Wege sichtbar machen.

### 1. Die Synthese der Di- und Polysaccharide

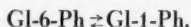
Der erste Schritt zur Synthese der Stärke ist, wenigstens formal, der Zusammentritt von 2 Molekülen Glucose zu einem Molekül Maltose.



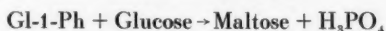
$\Delta G = + 4000 \text{ cal/Mol}$  (wenn alle Konzentrationen = 1 Mol in wässriger Lösung,  $\text{pH} = 7$ ). Die Reaktion ist also endergon (die umgekehrte Reaktion daher exergon und enzymatisch durchführbar). Wer mit dem Massenwirkungsgesetz vertraut ist, wird leicht einen Weg angeben können, auf dem es (theoretisch) möglich sein müßte, die Reaktion trotzdem von links nach rechts ablaufen zu lassen: es wäre nur notwendig, das Wasser als Lösungsmittel auszuschalten bzw. das bei der Reaktion entstehende Wasser zu entfernen. Tatsächlich werden ja in der chemischen Industrie viele hochpolymere Verbindungen, die unter Wasseraustritt entstehen (wie etwa die Bakelite), durch Erhitzen ihrer Bausteine über den Siedepunkt des Wassers hergestellt. Andere ähnliche Reaktionen werden durch Zusatz wasserentziehender Mittel in Gang gebracht. Alle diese Wege sind der lebenden Zelle verwehrt.

Es wurde schon früher gesagt, daß im biochemischen Geschehen eine endergone Reaktion dadurch umgangen wird, daß einer der beiden Reaktionspartner vorher auf ein höheres energetisches Niveau gebracht wird. Im Falle der Synthese von Maltose und Stärke geschieht dies in der Weise, daß ein Glucosemolekül mit einem Phosphatrest beladen wird. Eine solche „Beladungsreaktion“ wurde bereits beschrieben:  $\text{Glucose} + \text{ATP} \rightarrow \text{Glucose-6-Phosphat} + \text{ADP}$ . Nun geht die Stärkesynthese nicht vom Glucose-6-Phosphat aus, sondern vom Glucose-1-Phosphat, das den Phosphatrest an

einer anderen Stelle seines Moleküles trägt (Abb. 5). Die beiden Verbindungen können aber durch ein Enzym ineinander umgewandelt werden:



Geht nun die Synthese der Maltose von Glucose-1-Phosphat aus, so daß beim Zusammenschluß nicht ein Molekül Wasser, sondern ein Molekül Phosphat frei wird, dann ist die Reaktion exergon:



$\Delta G = -800 \text{ cal/Mol}$  (unter den obengenannten Bedingungen). Ähnlich liegen die energetischen Verhältnisse für die weitere Anfügung von Gl-1-Ph-Molekülen zu Stärke bzw. Glykogen<sup>5</sup>. Die Reaktionen verlaufen, nicht sehr stark, aber doch, „bergab“, so daß sie bei einigermaßen günstiger Nachlieferung von Glucose-1-Phosphat flüssig ablaufen können. Dadurch, daß diese Reaktionen nur „ganz flach bergab“ laufen, können sie, bei einer Verschiebung der Konzentrationsverhältnisse, auch leicht umgekehrt werden ( $\Delta G$  ändert sich ja mit der Konzentration, vgl. S. 674). So z. B. geschieht die Mobilisierung des Glykogens bei der tierischen Muskelarbeit nicht durch Hydrolyse, sondern durch „Phosphorolyse“:

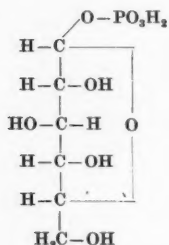
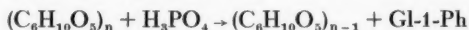
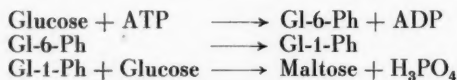


Abb. 5. Glucose-1-Phosphat.



Die Enzyme, die diese Spaltung katalysieren, heißen Phosphorylasen. Die gleichen Enzyme können (bei anderen Konzentrationsverhältnissen) die Synthese in Gang bringen.

Stellen wir nun noch die Reaktionen, die zur Synthese eines Moleküls Maltose aus 2 Molekülen Glucose notwendig sind, übersichtlich zusammen:

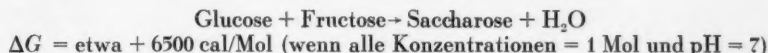


Man könnte also bei formaler Betrachtung der Summengleichung sagen: die endergone Synthese von Maltose aus Glucose wird dadurch erzwungen, daß sie mit dem (exergonen) Zerfall von einem Molekül ATP in ADP und  $\text{H}_3\text{PO}_4$  „gekoppelt“ wird. Eine analoge Rolle spielen das ATP und seine Verwandten bei fast allen Synthesevorgängen in der lebenden Zelle.

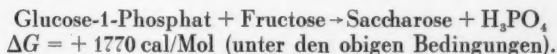
Als Spezialfall sei noch der Aufbau von Saccharose (Rohr- oder Rüben-

<sup>5</sup> Es sei erwähnt, daß nach den experimentellen Befunden (vgl. Baldwin 1957, S. 88) die Stärkesynthese in der lebenden Zelle sowie auch im enzymatischen Modellversuch nur dann in Gang kommt, wenn zumindest kleine Bruchstücke von Stärkemolekülen bereits vorher vorhanden sind. An diese werden dann weitere Glucose-Einheiten angefügt. In der vorliegenden Darstellung wurde jedoch die Synthese von Maltose aus Glucose der Übersichtlichkeit wegen in den Vordergrund gestellt.

zucker) aus Glucose und Fructose erwähnt. Hier liegen die energetischen Verhältnisse bei der direkten Reaktion besonders ungünstig:



Diese sehr ungünstige energetische Situation hat die Folge, daß die Reaktion auch dann, wenn man vom Glucose-1-Phosphat ausgeht, noch immer „bergauf“ geht, wenn auch nicht so steil wie beim direktem Verlauf:



Auch auf diese Weise können sich also noch keine nennenswerten Mengen von Saccharose bilden. In der Zelle muß für die Bildung dieses Zuckers daher ein noch größerer Umweg eingeschlagen werden: die Glucose wird nicht mit einem Phosphatrest, sondern mit einer viel größeren Gruppe „beladen“, nämlich mit dem Rest des Uridin-Diphosphates (vgl. Abb. 4). Die entstehende Verbindung heißt Uridin-Diphosphat-Glucose (UDPG) und hat die auf Abb. 6 wiedergegebene Konstitution.

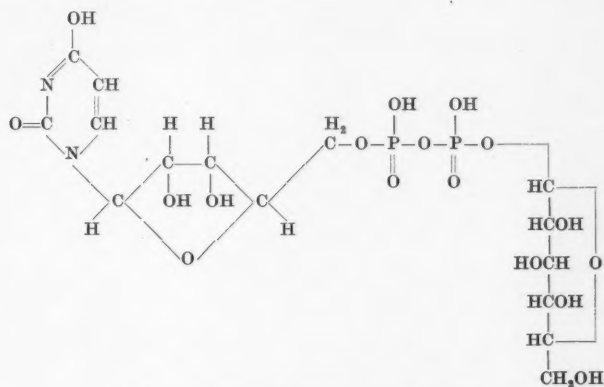
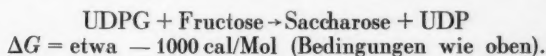


Abb. 6. Uridindiphosphat-Glucose (UDPG).

Von dieser UDPG aus geht nun die Saccharose-Synthese „bergauf“:



So wird, nach neueren Versuchsergebnissen, die Saccharose in der Pflanze tatsächlich hergestellt (Cardini, Leloir und Chiriboga 1953). Dabei ist zu bedenken, daß der Aufbau von UDPG eine ganze Reihe von Einzelreaktionen erfordert, die (je Mol. Glucose) insgesamt 2 Mol ATP verbrauchen (vgl. Baldwin 1957, S. 86). Wir sehen also, daß die Knüpfung einer energetisch besonders ungünstigen Bindung, wie etwa die Vereinigung von Glucose und Fructose, 2 Moleküle ATP erfordern kann.

## 2. Die Synthese der Proteine

Hier steht die Sache noch schlimmer als bei den Kohlehydraten. Die Grundreaktion, die (rein formal) zum Protein führt, ist die Vereinigung von Aminosäuren zu Peptiden. Wir besitzen thermodynamische Daten z. B. für die folgende Reaktion:



$\Delta G = +7520 \text{ cal/Mol}$ ,  $\Delta H = +5400 \text{ cal/Mol}$  (Borsook und Huffman 1938). Die Werte für andere Aminosäuren dürften in der gleichen Größenordnung liegen. Diese Reaktionen sind also so stark endergon, daß wir mit Sicherheit sagen können: auf diese Weise kann kein Eiweiß gebildet werden.

Es ist zu erwarten, daß im Zellstoffwechsel auch hier ein Umweg über ein aktiviertes Zwischenprodukt eingeschlagen wird.

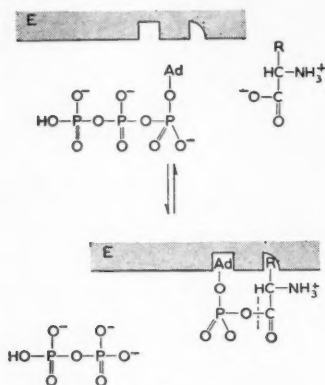


Abb. 7.

Abb. 7. Die Aktivierung der Aminosäuren bei der Proteinsynthese. (Nach Hoagland 1959.)

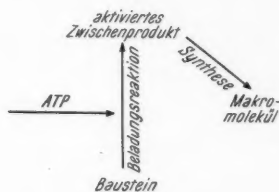


Abb. 8.

Abb. 8. Schema zur Makromolekülsynthese.

Neue amerikanische Untersuchungen (Hoagland 1960) zeigten, daß auch hier die energiereichen Phosphatverbindungen eine Rolle spielen. Es wurde schon oben bei der Synthese der Saccharose darauf aufmerksam gemacht, daß zur Knüpfung von energetisch besonders ungünstigen Bindungen 2 Moleküle energiereiches Phosphat pro Bindung nötig sein können. Ähnlich liegen die Dinge auch hier. Wir können auf Grund der genannten Arbeiten heute mit einiger Wahrscheinlichkeit sagen, daß zur Knüpfung einer Peptidbindung 1 Molekül Adenosintriphosphat (ATP) und 1 Molekül Guanosintriphosphat (GTP) nötig sind. Die erste Reaktion ist, wie zu erwarten war, auch hier eine Beladungsreaktion, bei der ein Aminosäuremolekül mit dem Rest des Adenosinmonophosphates verbunden wird (Abb. 7). Der weitere Verlauf ist noch nicht geklärt. Er ist aber jedenfalls dadurch kompliziert, daß es hier nicht wie bei den einfacheren Polysacchariden genügt, die Bausteine einfach aneinanderzureihen. Vielmehr hängt die Eigenart und die biologische Wirksamkeit der einzelnen Proteine ja wesentlich sowohl von der Reihenfolge der verschiedenen Aminosäuren in der Polypeptidkette ab als auch von der endgültigen Gestalt des Protein-

moleküls, die sich durch Faltung oder Schraubung dieser Polypeptidkette ergibt. Bekannt ist, daß man den Nucleinsäuren eine entscheidende Rolle bei dieser Phase der Proteinsynthese zuschreibt. Das ganze Gebiet wird gegenwärtig intensiv bearbeitet. Wir wissen bis jetzt gerade genug davon, um zu begreifen, daß die Sache bei weitem komplizierter ist als man sie sich noch vor kurzer Zeit vorstellte. (Bezüglich neuester Ergebnisse auf diesem Gebiet vgl. Hoagland 1960 sowie Stephenson, Hecht, Littlefield, Loftfield und Zamecnik 1959.)

Wir sehen also, wenn wir diesen ganzen Abschnitt noch einmal rückschauend überblicken, daß die Wege zur Biosynthese der verschiedenen Makromoleküle prinzipiell ähnlich sind. Stets ist diejenige Synthesereaktion, die von den direkten Spaltprodukten der betreffenden Makromoleküle ausgeht, endergon. Die Synthese in der Zelle muß daher über einen Umweg geführt werden: die Bausteine werden durch „Beladung“ mit einer von Fall zu Fall wechselnden Gruppe aktiviert. Von diesen aktivierten Zwischenprodukten aus verläuft dann die Synthesereaktion exergon, wobei die „Beladungsgruppe“ wieder abgespalten wird (Abb. 8).

So ist also die Synthese der für die Zelle lebenswichtigen Makromoleküle untrennbar verknüpft mit den energiereichen Verbindungen, die bei der Atmung erzeugt werden. Nun ist auch verständlich, warum Makromolekülsynthesen so schwer *in vitro* zu erhalten sind: es handelt sich ja um endergone, energieverbrauchende Vorgänge, die nur dann in befriedigender Weise ablaufen, wenn sie mit den energieliefernden Vorgängen der Atmung (oder Gärung) gekoppelt werden. Man kann allerdings die energiereichen Verbindungen (z. B. ATP) bzw. die aktivierten Zwischenprodukte auch aus Zell-Homogenaten extrahieren und ist dann in gewissen Fällen, wenn man über die entsprechenden Enzympräparate verfügt, imstande, einzelne Teilschritte der Biosynthese auch *in vitro* zu beobachten.

## VI. Der Kreislauf der makromolekularen Verbindungen

Mit der Synthese der Makromoleküle könnte der Aufbau des Zellenleibes für abgeschlossen gelten. Dem widerspricht die Erfahrung, daß eine Zelle nicht nur während des Wachstums, sondern auch in ausgewachsenem Zustand einen Stoffwechsel unterhält, Stoffe aufnimmt und abgibt. Die Zelle ist nicht wie ein Haus, das, einmal aufgebaut, in diesem Zustand längere Zeit stehenbleibt. Das Charakteristische am Lebendigen liegt ja nicht in dem kunstvollen Bau der Zellen und Organismen, der freilich auch bewundernswert und unnachahmlich ist, sondern vielmehr in der Dynamik, die ihnen innewohnt.

Dies hat alte ärztliche Weisheit offenbar schon seit langem gefühlsmäßig erfaßt und für den menschlichen Organismus den Satz geprägt, daß der Körper nicht der gleiche bleibe, sondern durch dauernden Abbau und Wiederaufbau in einem 7jährigen Zyklus erneuert werde. Wissenschaftlich untersuchbar wurde diese Eigenart des Lebens erst, als Isotope der natürlichen Elemente in ausreichenden Mengen zur Verfügung standen. Als erstes solches Element wurde etwa um die Mitte der Dreißigerjahre das Deuterium (der „schwere Wasserstoff“) für die Wissenschaft verfügbar. Nicht lange danach (1941) erschien dann auch das Buch von Schönheimer: *The dynamic state of body constituents*. Durch diese und zahlreiche weitere Un-

tersuchungen (vgl. Haurowitz 1959, S. 233 ff.) wurde der oben erwähnte gefühlsmäßig ausgesprochene Satz auf breiter experimenteller Grundlage bestätigt.

Die meisten dieser Untersuchungen wurden an Tieren und am Menschen durchgeführt: Proteine, die mit radioaktiven Isotopen markiert sind, werden in die Blutbahn gespritzt. Man verfolgt dann die Konzentrationsveränderungen dieser Proteine im Blutplasma und in den Geweben. Ähnliche Untersuchungen wurden auch mit anderen Stoffen gemacht. Die Ergebnisse weisen alle in die gleiche Richtung und sagen uns Folgendes: obwohl der Körper eines ausgewachsenen Organismus oder eine ebensolche Zelle ihre durchschnittliche Zusammensetzung, also ihren Gehalt an Proteinen, Lipoiden, Kohlehydraten usw., im Laufe der Zeit nicht wesentlich ändern, gehen doch fortwährend tiefgreifende Umsetzungen vor sich. Es sind zwar von diesen Substanzen nach Ablauf einer gewissen Zeit etwa gleich viele Moleküle vorhanden wie vorher, aber nicht die gleichen Moleküle. Dauernd finden Abbau-, Umbau- und Aufbauvorgänge nebeneinander statt. Wir haben Grund zu der Vermutung, daß diese Vorgänge in jeder einzelnen Zelle vor sich gehen. Es wird da natürlich Abstufungen in der Intensität geben: in physiologisch besonders aktiven Zellen wird sich dieser Umbau rascher vollziehen als in den ruhenden. Auch werden nicht alle Teile einer Zelle in gleichem Maße von solchen Vorgängen erfaßt sein. Bei der Pflanzenzelle z. B. wird die Zellwand wohl am wenigsten an ihnen teilnehmen, die in der Vakuole enthaltenen Stoffe schon in höherem Maße, am meisten natürlich die Bestandteile des Protoplasmas.

Versuchen wir nun an Hand eines Beispiels uns über das Wesentliche an diesen Vorgängen klar zu werden. Von besonderer Bedeutung scheinen die beschriebenen Umbauvorgänge (im Englischen „turnover“ genannt) im Stoffwechsel der Proteine zu sein. Damit sie ablaufen können, muß eine Zelle einerseits proteinspaltende Enzyme (Proteinasen) enthalten, andererseits das System des Proteinaufbaues. Abbau und Aufbau gehen dann (in der ausgewachsenen Zelle) mit etwa gleicher Geschwindigkeit nebeneinander vor sich. Dies hat zur Folge, daß einerseits eine bestimmte, gleichbleibende Konzentration an Protein (vor allem wohl Enzym-Protein) vorhanden ist, andererseits eine gewisse stationäre Konzentration, ein Reservoir (engl. „pool“) an Aminosäuren, aus dem einerseits die Proteinsynthese schöpfen kann und das andererseits mit den Vorgängen der Aminosäuresynthese in Verbindung steht. Es handelt sich also um einen Gleichgewichtszustand. Nun gibt es verschiedene Arten von Gleichgewichten: wir können einen Zustand, der demjenigen in der Zelle in einer Hinsicht ähnelt, dadurch erreichen, daß wir in einer Epruvette eine Lösung von Protein mit einer Lösung von Aminosäuren mischen. In diesem Falle haben wir es auch mit gleichbleibenden Konzentrationen an diesen beiden Typen von Verbindungen zu tun. Der Unterschied gegenüber der lebenden Zelle ist klar: es laufen hier keine Reaktionen ab. Es handelt sich um ein statisches Gleichgewicht. In der Zelle jedoch wird die gleichbleibende Konzentration dadurch erreicht, daß die Aufbau- und Abbauvorgänge gleich schnell ablaufen. Würde nichts weiter als dies geschehen, so hätten wir den vorliegenden Zustand ein dynamisches Gleichgewicht zu nennen und das System, in dem er zustande kommt, ein geschlossenes System. Es würde ja keine Zufuhr oder Abgabe von Substanz stattfinden, sondern die beim Abbau entstehenden Bausteine würden wieder beim Aufbau eingesetzt werden.



Wir wissen, daß dies in der lebenden Zelle nicht der Fall ist, einerseits in substantieller Hinsicht: der Aminosäure-„Pool“ steht ja nicht nur mit dem Proteinabbau und -aufbau in Verbindung, sondern einerseits mit den Reaktionsketten der Aminosäuresynthese, andererseits mit zahlreichen anderen chemischen Vorgängen, die von den Aminosäuren ausgehen. Es wird also vorkommen, daß Aminosäuremoleküle aus dem Synthesestoffwechsel neu an den Proteinaufbau abgegeben werden, andererseits werden Aminosäuremoleküle, die durch Proteinabbau entstehen, auch anderen Reaktionen (etwa dem Aufbau von Alkaloiden oder dgl.) zugeführt werden. Wir haben es also nicht mit einem geschlossenen, sondern mit einem offenen System zu tun. Besonders deutlich wird dies aber, wenn man die energetische Seite der Sache betrachtet. Die Spaltung der Proteine zu Aminosäuren ist ein Hydrolyseprozeß, der nach S. 682 exergon („bergab“) und exotherm, d. h.

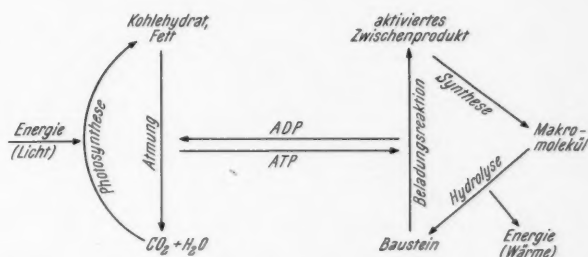


Abb. 9. Schematische Darstellung des Zusammenhanges zwischen den energieliefernden Stoffwechselvorgängen und der Makromolekülsynthese.

unter Wärmeabgabe, verläuft. Zum Aufbau der Proteine ist hingegen eine Zufuhr von Energie in Form von energiereichen Verbindungen (ATP) nötig. Wenn nun diese beiden Vorgänge dauernd nebeneinander ablaufen, dann ist auch eine dauernde Energiezufuhr von der Atmung her nötig und es findet eine dauernde Abgabe von Energie in der entwerteten, für das Leben nicht mehr brauchbaren Form der Wärme statt. Das nachstehende Schema (Abb. 9), eine Erweiterung der Abb. 8, soll dies deutlich machen. Das System des Proteinstoffwechsels ist also ein Gleichgewicht, das sich nicht selbst genügt, sondern sich gegen einen dauernden Durchfluß von Materie und Energie aufrecht erhält bzw. diesen Durchfluß braucht, um bestehen zu können. Ein solches System hat Bertalanffy (1942) ein Fließgleichgewicht genannt. Solchen Fließgleichgewichten begegnet man nun im biologischen Geschehen sehr häufig, ja eine ganze Zelle, ein ganzer Organismus ist eigentlich ein großes und sehr komplexes Fließgleichgewicht. Abb. 9 zeigt z. B., wie die Energie durch eine Zelle einer autotrophen Pflanze hindurchfließt: die einstrahlende Lichtenergie wird zunächst in endergonen Reaktionen in die chemische Energie der Assimilate verwandelt, dann im Laufe der Atmung zu energiereichen Verbindungen umgesetzt<sup>6</sup>, welche zur Synthese der Makromoleküle verbraucht werden. Schließlich

<sup>6</sup> Energiereiche Phosphatverbindungen, besonders ATP, können übrigens auch direkt bei der Photosynthese gebildet werden.

wird die Energie bei der Hydrolyse der Makromoleküle in der „entwerteten“ Form der Wärme wieder frei.

Wenn auch ein solcher Aufbau des Makromolekülstoffwechsels aus Kreisprozessen („Elementarzyklen“ nach Schulz 1950) noch nicht in allen Einzelheiten streng bewiesen ist, so gibt es doch sehr viele experimentelle Ergebnisse, die für das vorgetragene Konzept sprechen. Die besondere Stärke dieser Theorie besteht aber darin, daß sie mit einer ganzen Reihe von allgemeinen Eigentümlichkeiten des Lebens in befriedigender Weise übereinstimmt: so wird z. B. auf einmal verständlich, warum auch ein Organismus, der keine sichtbare Arbeit leistet, dauernd atmen muß. Die Aufrechterhaltung des lebenden Zustandes ist ja nach der dargestellten Theorie an den dauernden Ablauf von Kreisprozessen gebunden, die in ihrem synthetischen Teil fortwährend ATP verbrauchen, das bei der Atmung gebildet werden muß.

Ferner können wir nun viel besser bestimmte Eigenschaften des Zellstoffwechsels verstehen, vor allem seine große Elastizität und Regulierbarkeit. Hierfür haben offenbar wieder die Proteine eine besondere Bedeutung. Es sei an die bekannte Tatsache erinnert, daß alle Enzyme Proteine sind, bzw. daß ein wesentlicher Teil des im Protoplasma enthaltenen Proteins in Gestalt von Enzymmolekülen vorliegt. Diese Eiweißmoleküle wären nun, wie viele Proteine in wässriger Lösung, einer allmählichen Alterung und Denaturierung unterworfen, wenn sie nicht immer wieder erneuert würden. Wichtig ist dabei, daß die Erneuerung wahrscheinlich rascher abläuft als die Denaturierung, so daß es wohl gar nicht zu letzterer kommt. So werden also die Katalysatoren, deren Art und Menge für das Gesamtgefüge des Stoffwechsels maßgebend ist, immer wieder „eingeschmolzen“ und neu hergestellt, gegebenenfalls wohl auch in veränderten Mengenverhältnissen. Es ist klar, daß der Stoffwechsel dadurch sehr elastisch wird und auf äußere Einflüsse in zweckmäßiger Weise reagieren kann. Von hier aus ist z. B. auch die Erscheinung der „enzymatischen Adaptation“ zu verstehen: bestimmte Zellen, vor allem von Mikroorganismen, können bei Änderung der Umweltverhältnisse Enzyme produzieren, die vorher nicht in merklicher Menge, gleichsam nur keimhaft, vorhanden waren. So entwickeln z. B. Hefe-Arten, die zunächst nur auf die Vergärung von Glucose eingestellt waren, die Fähigkeit zur Vergärung von Galactose, wenn man ihnen längere Zeit hindurch diesen Zucker anbietet. Es wird also ein Enzym, das die Galactose anzugreifen vermag, in verstärktem Maße produziert. Eine mögliche Erklärung dafür gibt Schulz (1950, S. 226): „Das würde automatisch dann erreicht werden, wenn ein ‚arbeitendes‘ Protein langsamer als ein ruhendes abgebaut würde, etwa dadurch, daß das Substrat eines Fermentes das Hinzutreten des Abbauf fermentes erschwerte, indem es dessen Oberfläche blockiert. Dadurch würde eine Anreicherung des betreffenden Proteins eintreten, da der synthetische Teil des Elementarzyklus mit unveränderter Geschwindigkeit weiterläuft.“ Auf den zitierten Aufsatz von G. V. Schulz, der offensichtlich zu wenig beachtet worden ist, sei hier nochmals nachdrücklich hingewiesen. Vgl. dazu auch Haas 1955, S. 436 ff.

Auch für das Virusproblem ergeben sich neue Aspekte. Wir können nun klar formulieren, in welcher Hinsicht sich die Viren physiologisch von einer lebenden Zelle grundsätzlich unterscheiden: ein isoliertes Virusteilchen besitzt keinen Stoffwechsel, keine Dynamik. Es ist als statisches

System von kristallähnlich geordneten Stoffen aufzufassen. Entsprechende Versuche (vgl. Broda 1959, S. 224) haben gezeigt, daß isolierte Viren keine Atmung besitzen. Daraus müssen wir schließen, daß die Viren bei ihrer „Vermehrung“ in der lebenden Zelle, bei der sie also den Anstoß zur Synthese der ihnen eigenen Proteine und Nucleinsäuren geben, einen wesentlichen Schritt nicht selbst vollziehen können, nämlich die Aktivierung der Bausteine, zu der ja das Atmungsprodukt ATP nötig ist. Das Virus ist vielmehr auf die aktivierten Zwischenprodukte angewiesen, die die Zelle für den Bedarf ihrer eigenen Makromolekülsynthese herstellt. Wir dürfen also annehmen, daß wenigstens die einfachen (phytopathogenen) Viren nur über eine einzige chemische Potenz verfügen: sie vermögen die in der Zelle verfügbaren, aktivierten Zwischenprodukte in der für ihre eigenen Makromoleküle typischen Art zusammenzufügen. Dies ist also ein einziger Reaktionsschritt aus dem in Abb. 9 wiedergegebenen Stoffwechselgefüge.

Es darf allerdings nicht verschwiegen werden, daß es auch zahlreiche sehr kompliziert gebaute Viren gibt, deren chemische Potenzen wir noch keineswegs durchschauen. Aber auch für diese erscheint die Annahme berechtigt, daß sie außerhalb der lebenden Zelle in einem statischen Zustand vorliegen.

So hat uns die biochemische Forschung der letzten beiden Jahrzehnte auch in allgemein-biologischer Hinsicht um zwei wesentliche Schritte weiter geführt: Wir können nun verstehen, in welcher Form die bei der Atmung produzierte Energie dem Aufbaustoffwechsel zugeführt wird, und wir haben eine (wenn auch zunächst noch schwache) Vorstellung davon bekommen, wie der dynamische Zustand des lebenden Protoplasmas durch dauernde Energiezufuhr von der Atmung her aufrechterhalten wird.

Diesen Fortschritten unserer Erkenntnis liegen bewundernswerte experimentelle Leistungen sehr zahlreicher Forscher zugrunde. Nur ganz wenige von ihnen konnten mit ihren Originalarbeiten zitiert werden. Im allgemeinen wurden die Sammelwerke angegeben, die weitere Informationen zu bieten vermögen.

Die Arbeit auf dem besprochenen Gebiet ist weiterhin in vollem Fluß. Wir wollen ihren neuen Ergebnissen erwartungsvoll entgegensehen.

#### Literatur

- Baldwin, E., 1957: Biochemie. Einführung in ihre Dynamik. Weinheim.  
 Bertalanffy, L. v., 1942: Theoretische Biologie. Zweiter Band: Stoffwechsel, Wachstum. Berlin-Zehlendorf.  
 Borsook, H., and H. M. Huffman, 1938: Some thermodynamical considerations of amino acids, peptides and related substances. In: C. L. A. Schmidt: The Chemistry of Amino Acids and Proteins. S. 822—870. Springfield/Baltimore.  
 Broda, E., 1959: Biochemie der Viren. Ein Bericht über das Symposium VII. Proceedings of the Fourth International Congress of Biochemistry, Vienna. Vol. XIV, 210.  
 Cardini, C. E., L. F. Leloir, and J. Chiriboga, 1955: The Biosynthesis of Sucrose. J. Biol. Chem. 214, 149.  
 Dixon, M., and E. C. Webb, 1958: Enzymes. London-New York-Toronto.  
 Haas, J., 1955: Physiologie der Zelle. Berlin-Nikolassee.  
 Haehn, H., 1952: Biochemie der Gärungen. Berlin.

- Haurowitz, F., 1959: Progress in Biochemistry since 1949. Basel/New York.
- Hoagland, M. B., 1960: Enzymatic reactions between amino acids and ribonucleic acids as intermediate steps in protein synthesis. Proceedings of the Fourth International Congress of Biochemistry, Vienna. Vol. VIII, 199.
- Holzer, H., 1956: Freie Enthalpien biologisch wichtiger Gleichgewichte. In: Biochemisches Taschenbuch, hersg. v. H. M. Raue, S. 688, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Klotz, I. M., 1957: Some Principles of Energetics in biochemical Reactions. New York.
- Lehnartz, E., 1959: Einführung in die chemische Physiologie. 11. Auflage. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Lipmann, F., 1941: Metabolic Generation and Utilization of Phosphate Bond Energy. Adv. Enzymology 1, 99.
- Netter, H., 1959: Theoretische Biochemie. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Schönheimer, R., 1941: The dynamic state of body constituents. Cambridge (Mass.).
- Schulz, G. V., 1950: Über den makromolekularen Stoffwechsel der Organismen. Naturwiss. 37, 196—200, 225—229.
- Stephenson, M. L., L. I. Hecht, J. W. Littlefield, R. B. Loftfield, and P. C. Zamecnik, 1959: Intermediate Reactions in Protein Synthesis. In: Subcellular Particles. The Fifth Annual Symposium Publication of the Society of General Physiologists. Edited by T. Hayashi. S. 160. New York.

## Referate

**Chemie der Genetik.** 9. Colloquium der Gesellschaft für physiologische Chemie in Mosbach/Baden. Mit 61 Textabb., VI, 173 S. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag 1959. DM 28.60.

Ein Leser, der die Entwicklung der Genetik in den letzten Jahren nicht genau verfolgt hat, wird überrascht sein. Er findet keine Arbeit, die der „klassischen Genetik“, also etwa den Kreuzungsversuchen an Tieren und Pflanzen und ihrer cytologischen Analyse, zugehört. Der Schwerpunkt liegt vielmehr einerseits auf der Feinstruktur und der Chemie des Zellkernes, und zwar nicht nur des Zellkernes in situ, sondern auch der Zellkerne, die sich als Homogenatfraktion isolieren und analysieren lassen (Vorträge von H. Ris, G. Siebert und M. Alfert). Der zweite Schwerpunkt liegt bei den Mikroorganismen, speziell den Bakterien, die ja in der biochemischen Forschung der letzten Jahrzehnte eine überragende Bedeutung gewonnen haben. Auf bakteriengenetischem Gebiet sind in der letzten Zeit vor allem gewisse Erbänderungserscheinungen wichtig geworden, die nicht auf Mutation, sondern auf einer Übertragung genetischen Materials von einer Bakterienzelle auf eine andere beruhen. Es handelt sich dabei erstens um die sog. „Transformation“ (Übertragung eines zellfreien Agens, wahrscheinlich DNS, von einem Bakterienstamm auf einen anderen und dadurch bedingte Erbänderung: Vortrag A. Wacker), zweitens um die Rekombination von Genomteilen zweier Zellen nach parasexuellen Vorgängen und drittens um die sog. „Transduktion“, d. h. die Übertragung genetischen Materials durch Virus- (Bakteriophagen-) Teilchen (Vortrag F. Kaude-witz). Auch an den Bakteriophagen selbst wird heute eine Genetik im weitesten Sinne betrieben (Vortrag W. Weidel). Ein Vortrag von J. Waldenström über die genetische Kontrolle der Eiweißsynthese beschließt den sehr interessanten Band.  
H. Kinzel (Wien).

**Dynamik des Eiweißes.** 10. Colloquium der Gesellschaft für physiologische Chemie am 9. bis 12. April 1959 in Mosbach/Baden. Mit 64 Textabb., VI, 200 S. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag 1960. DM 29.80.

„Es wäre schwierig, ein biochemisches Problem zu finden, das während des letzten Dezenniums die Aufmerksamkeit vieler Forscher mehr beschäftigt hätte als die Biosynthese der Proteine“ — sagt V. V. Koningsberger am Anfang seines Vortrages. Dieser Satz dürfte nicht übertrieben sein, zumal wenn man hinzufügt, daß ja die Synthese der Proteine mit ihrem stets nebenher laufenden Abbau einen Kreislauf formiert, der aus energetischen Gründen mit der Atmung gekoppelt sein muß und so wohl als einer der grundlegenden Stoffwechselvorgänge in der Zelle betrachtet werden muß.

Dieser „Dynamik des Eiweißes“ im engeren Sinne ist der erste lange Vortrag von W. Maurer gewidmet („Die Größe des Umsatzes von Organ- und Plasmaeiweiß“). V. V. Koningsberger gibt dann einen Überblick über die zu erwartenden Teilreaktionen bei der Synthese. Einige dieser Teilreaktionen werden später in eigenen Vorträgen behandelt: F. Gros

berichtet über die Rolle der Acceptor-RNS, P. W. Jungblut und F. Turba besprechen die Funktion der „Mikrosomen“ (es muß erwähnt werden, daß die Zweckmäßigkeit des letztgenannten Terminus gegenwärtig zur Diskussion steht, vgl. K. Höfler, diese Zeitschrift 48, 167 und 52, 295).

Den Pflanzenphysiologen wird der Vortrag von K. Mothes interessieren, besonders seine wichtige Entdeckung, daß das Nachströmen der Aminosäuren zum Ort der Proteinsynthese nicht durch Diffusion erfolgt, sondern mit Hilfe aktiver Transportmechanismen, durch die eine bedeutende Anhäufung von Aminosäuren auch in solchen Pflanzenteilen zustande kommen kann, in denen keine auffallende Proteinsynthese stattfindet. Ob solche Mechanismen auch im tierischen Stoffwechsel eine Rolle spielen, scheint noch nicht untersucht worden zu sein.

Über zwei Spezialfälle von Proteinsynthese berichten schließlich noch J. Monod („Information, induction, repression dans la biosynthese d'un enzyme“) und H. E. Schultze („Bildung der Antikörper“).

Die Bände des alljährlichen Mosbacher Colloquiums bedürfen kaum mehr einer Empfehlung, da ja das Interesse der Physiologen an den stets aktuell gewählten Themen und an deren Behandlung durch bedeutende Fachleute selbstverständlich ist.

H. Kinzel (Wien).

**Handbuch der Pflanzenphysiologie.** Encyclopedia of Plant Physiology. Herausgegeben von W. Ruhland. Band 10: Der Stoffwechsel sekundärer Pflanzenstoffe. Redigiert von P. Schwarze. Mit 57 Abb., XV, 854 S., Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag 1958. Ganzl. DM 198.—.

Die Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe ist eines der reizvollsten, aber auch eines der methodisch schwierigsten Gebiete der Stoffwechselphysiologie. Die Mannigfaltigkeit dieser Pflanzeninhaltskörper ist ein gleichwertiges Gegenstück zur morphologischen Mannigfaltigkeit der Pflanzenwelt. Über die Abgrenzung des Gebietes gibt es verschiedene Auffassungen. Im vorliegenden Handbuch wurde eine Stoffgruppe, die sicherlich den sekundären Pflanzenstoffen zuzuzählen ist, nämlich die der Alkaloide und Amine, bereits im Rahmen ihres natürlichen Verwandtschaftskreises (im Band VIII: Stickstoffumsatz) behandelt. Zwei weitere Verbindungsklassen, die oft (aber nach Ansicht des Referenten zu Unrecht) zu den sekundären Pflanzenstoffen gestellt werden, haben in anderen Bänden angemessenen Platz gefunden: Die Fette im Band VII und die aliphatischen Carbon- und Oxy-carbonsäuren im Band XII (Atmung).

So ist der referierte Band vor allem zwei großen Verwandtschaftskreisen gewidmet: Den Terpenoiden und den stickstofffreien aromatischen Verbindungen. Die Terpene werden — nach einem einleitenden Überblick von O. Moritz — in vier Gruppen geteilt: Über die niederen Terpene (ätherische Öle und Harze) berichten A. J. Haagen-Smit in chemischer und J. Kisser in pflanzenanatomischer Hinsicht. Die Phytosterine werden von A. Heusner behandelt, die Carotinoide von T. W. Goodwin, Kautschuk und Latex von B. Arreguin. Ein Abschnitt über Wachs, Cutin und Kork (bearbeitet von D. R. Kreger und H. Mader) schließt sich an.

Der Aufmarsch der aromatischen Verbindungen wird von den Anthocyanen, Flavonen und Xanthonen eröffnet (F. Blank). Die Gerbstoffe erläutert W. Mayer, ein Aufsatz über Lignin und Ligninbildung (F. F. Nord und G. de Stevens) folgt. C. E. Ballou behandelt den Inosit und seine Verwandten, deren Platz in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Benzolderivaten im engeren Sinne nicht ganz glücklich gewählt er-



scheint. Der Abschnitt „Phenole, Chinone und die biogene Bildung von Benzolkernen“ wurde in zwei Teile geteilt: Die an Mikroorganismen (vor allem Pilzen und Bakterien) erhaltenen Versuchsergebnisse beschreibt W. C. Evans, die entsprechenden Angaben für die höheren Pflanzen bringt P. Schwarze. Ein Abschnitt über den Stoffwechsel der Phenylpropanderivate (von T. A. Geissman) beendet diesen Teil des Werkes.

Das Schlusskapitel aus der Feder von S. Shibata führt uns noch in eine eigenartige und reizvolle Welt, nämlich in das Gebiet der Flechtensstoffe.

Die Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe ist in der gegenwärtigen Lage der stoffwechselphysiologischen Forschung deswegen so bedeutungsvoll und fesselnd, weil hier wie kaum anderswo biogenetische Zusammenhänge auftauchen. Die Ganzheit des Stoffwechsels beginnt wie hinter einem zurückweichenden Vorhang sichtbar zu werden. Den neu entdeckten biosynthetischen Reaktionswegen wird denn auch in den einschlägigen Kapiteln gebührende Beachtung geschenkt.

Dem Bandredakteur P. Schwarze wird man für die gelungene Gestaltung des Bandes und für die hübsche, mit viel biologischem Verständnis geschriebene Einleitung dankbar sein. Für Karl Paech, den viel zu früh Verstorbenen, dessen Lebenswerk beim Durchblättern immer wieder aufleuchtet, soll der Band ein bleibendes Denkmal sein.

H. Kinzel (Wien).

**Huxley, Julian: Krebs in biologischer Sicht.** (Biological Aspects of Cancer). Deutsche Übersetzung von Dr. Chr. Landschütz und Christiane Landschütz, München. VIII, 120 S. Stuttgart: Georg Thieme 1960. Kart. DM 14.80.

Daß der Krebs nicht nur für die Humanmedizin ein eminentes Problem ist, sondern ebenso eine Grundfrage der Lebensforschung, darüber waren sich einzelne Biologen schon lange im klaren. So hat z. B. Heilbrunn diese Erkenntnis in den lapidaren Satz geprägt: Cancer is uncontrolled cell division. Die Wissenschaft sucht nach den Ursachen dieses schrankenlosen Teilungswachstums, nach den Faktoren, die eine normale Körperzelle in eine Krebszelle transformieren können. Es gibt anscheinend — oder vielleicht sollte man sagen scheinbar — mannigfaltige derartige Faktoren. Das lehrt nicht nur die Medizin, sondern auch die Zoologie und die Botanik. Wohl kaum jemand hat bisher den doppelgesichtigen Januskopf des Krebsproblems den Medizinern und Biologen in so überzeugender und einprägsamer Darstellung vor Augen gehalten als Julian Huxley. Langjährige Literaturstudien haben es ihm ermöglicht, aus der menschlichen, tierischen, pflanzlichen Ontologie, aber auch aus der Virologie, Genetik und Epigenetik das fast unaßbar verzweigte Tatsachenmaterial herauszuschälen, das heute erforderlich ist, um das Rätsel des Krebs wirklich in biologischer Sicht zu sehen, zu beleuchten und zu erleuchten. Die Lektüre der Schrift ist nicht ganz leicht, denn sie setzt Kenntnisse voraus, die nicht jeder hat. Jeder, der guten Willens ist, kann sich aber durcharbeiten, denn die reichlich zitierte und wohl ausgewählte, sich allerdings in erster Linie auf englische Arbeiten beschränkende Literatur ermöglicht es, sich weiter zu orientieren. Das Schrifttum ist bis 1957 berücksichtigt; natürlich hat seitdem der breite Strom der einschlägigen Arbeiten nicht haltgemacht, ist unaufhaltsam weitergeflossen und hat von den verschiedensten Disziplinen her neue Zuflüsse erhalten. Es ist zu hoffen, daß der Autor diesem erfolgversprechenden Fortschritt durch neue Auflagen dieser wertvollen Schrift immer wieder Rechnung tragen wird.

F. Weber (Graz).

**Netter, Hans: Theoretische Biochemie.** Physikalisch-Chemische Grundlagen der Lebensvorgänge. Mit 243 Abb., IX, 816 S., Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag 1959. Ganzl. DM 88.—.

Im Jahre 1926 erschien das bekannte, große Werk von Höber: „Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe“ in seiner 6. und letzten Auflage. (Eine Neubearbeitung 1947 entsprach nicht dem alten Konzept.) Das Buch galt seinerzeit als das Standardwerk, aus dem viele Jahrgänge von Biologen ihr physikochemisches Wissen bezogen. Seit seinem letzten Erscheinen bestand auf diesem Gebiet eine wirkliche Lücke. Nun legt Höbers Nachfolger auf dem Lehrstuhl in Kiel, Hans Netter, das referierte Werk vor, das seinem Inhalt und seinem Umfang nach dazu berufen erscheint, die Stellung des alten Höberschen Buches einzunehmen. Vergleicht man den Inhalt der beiden Werke, dann fällt auf, daß Höbers „Physikalische Chemie“ zum überwiegenden Teil diejenigen Themen behandelt, die Netter in der ersten Hälfte seines Buches unter dem Titel „Statik“ wiedergibt (also die osmotischen und elektrolytischen Gleichgewichte, die Redoxpotentiale, die Kolloidchemie u. dgl.). Die Problemkreise, die den zweiten Teil des Werkes von Netter füllen („Dynamik“), waren zu Höbers Zeit erst ansatzweise vorhanden: Die Thermodynamik des biologischen Energiegewinnes und Energiwechsels, die Oxydationssysteme der Zelle, die Reaktionskinetik der enzymatischen Steuerungsvorgänge. Hier haben ja die letzten Jahre und Jahrzehnte grundlegende neue Erkenntnisse gebracht.

Über dem Eingang zu diesem Buch scheint freilich das griechische Wort zu stehen, daß kein der Mathematik Unkundiger den Eintritt wagen solle. Nun wird zwar kein vernünftiger Mensch verlangen, in der physikalischen Chemie völlig auf die formelmäßige Darstellung von Gedankengängen zu verzichten, aber der Biologe hätte doch den Wunsch, daß möglichst oft anschaulichere, vielleicht auch bildhafte Formulierungen gebraucht werden, die dem physikochemischen Anfänger den Eintritt in diese Wissenschaft erleichtern (man kann in dieser Hinsicht bei gutem Willen viel tun!). Es wird vielleicht nicht viele Biologen geben, die den Gedankengängen des Werkes in allen Teilen zu folgen vermögen.

Trotzdem wird der Biologe natürlich viel lieber zum „Netter“ greifen als zu einem Lehrbuch der physikalischen Chemie. Hier ist ja mit großer Mühe, für die wir dem Autor wirklich dankbar sein müssen, alles physikochemische Wissen zusammengetragen, das in biologischer Hinsicht interessant ist. Man findet auch schwer zugängliche Spezialgebiete behandelt, die sonst kaum irgendwo so vollständig zusammengestellt sind. Bei alledem vermeidet der Autor in anerkennenswerter Zurückhaltung den Anschein, als hätte er eine lückenlose physikochemische Interpretation des Lebensgeschehens zu bieten. Das Buch will vielmehr eine gediegene und gründliche Zusammenstellung physikochemischen Wissens sein, ein Überblick über alles, was im molekularen Bereich des Lebens meßbar und berechenbar ist. Damit soll dem wissenschaftlich arbeitenden Biologen das Rüstzeug für ein vertieftes Verständnis der beobachteten Erscheinungen in die Hand gegeben werden. In dieser Zielsetzung ist das Werk im Kreise der Biologen natürlich hochwillkommen und wird die Arbeit in Forschung und Lehre sicherlich auf mancherlei Weise befruchten.

H. Kinzel (Wien).

# PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

**J. BRACHET**  
BRUXELLES

**N. KAMIYA**  
OSAKA

**A. PISCHINGER**  
WIEN

**S. STRUGGER**  
MÜNSTER

HERAUSGEGEBEN VON

**JOSEF SPEK**  
ROSTOCK

**FRIEDL WEBER**  
GRAZ

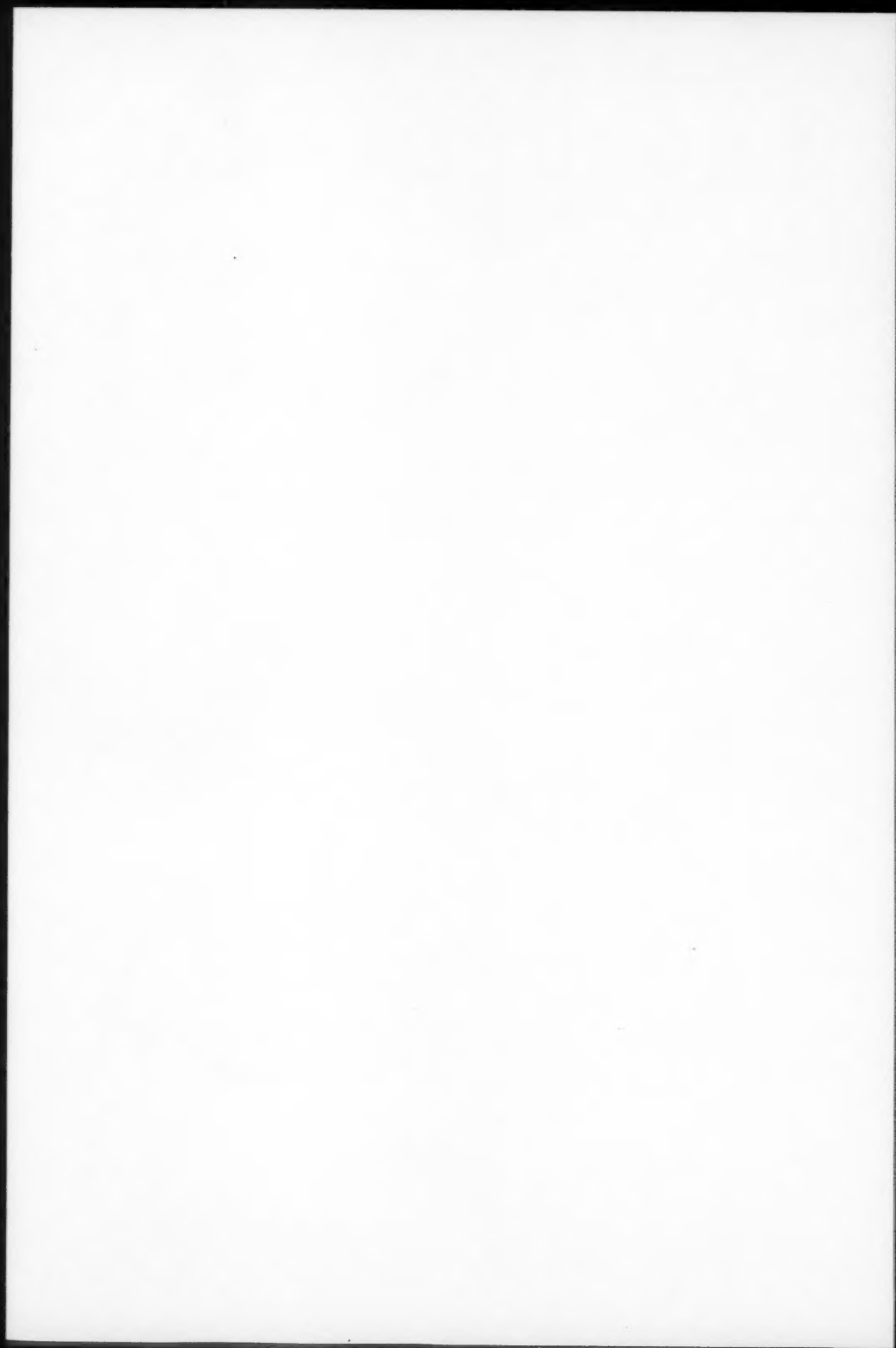
**KARL HÖFLER**  
WIEN

## LII. BAND

MIT 327 TEXTABBILDUNGEN



**WIEN**  
**SPRINGER-VERLAG**  
1960



# Inhalt

## Abhandlungen

<b>Arens, K.:</b> Polarisationsmechanismus der Zelle . . . . .	26
<b>Arisz, W. H.:</b> Sympasmatischer Salztransport in <i>Vallisneria</i> -Blättern . . . . .	309
<b>Bancher, E. und J. Hölzl:</b> Mikrophotometrische Untersuchungen zur Neutralrot-speicherung in den Vakuolen der Innenepidermis von <i>Allium cepa</i> . . . . .	31
— <b>J. Hölzl und J. Klima:</b> Licht- und elektronenmikroskopische Beobachtungen an der Kutikula der Zwiebelschuppe von <i>Allium cepa</i> . . . . .	247
<b>Böhm-Tüchy, Elisabeth:</b> Plasmalemma und Aluminiumsalz-Wirkung . . . . .	108
<b>Enöckl, F.:</b> Uranin-Fluorochromierung von <i>Allium</i> -Zellen nach Vorbehandlung mit Ammonkarbonat . . . . .	344
— Über den Zustand des Plasmas in vakuolenkontrahierenden <i>Anchusa</i> -Zellen . . .	567
<b>Freytag, K.:</b> Die Doppelbrechung des Schleimes von <i>Tilia ulmifolia</i> Scop. . . . .	53
<b>Hatano, S. und I. Takeuchi:</b> ATP Content in Myxomycete Plasmodium and its Levels in Relation to Some External Conditions . . . . .	169
<b>Höfler, K.:</b> Über die Permeabilität der Diatomee <i>Caloneis obtusa</i> . . . . .	5
— Meiosomes and Groundplasm . . . . .	295
<b>Kelbitsch, Helga:</b> <i>Cuscuta</i> als Überträger des Crown-gall-erzeugenden Prinzips . .	437
<b>Kramer, G.:</b> Plasmaeinschlüsse bei einigen Desmidiaceen-Gattungen . . . . .	184
<b>Linke, W.:</b> Wärmebewegungen beim Koazervationsprozeß . . . . .	376
<b>Miličić, D., und Zlata Udjbinac:</b> Die Eiweißkristalle von <i>Capsicum annuum</i> sind Viruskörper. . . . .	446
<b>Mitrakos, K.:</b> Feinbau und Teilung bei Plastiden einiger Florideen-Arten . . . . .	611
<b>Nakajima, H.:</b> Some Properties of a Contractile Protein in a Myxomycete Plasmodium . . . . .	413
<b>Nakazawa, S.:</b> Morphogenesis of the Fern Protonema . . . . .	1
— Nature of the Protoplasmic Polarity . . . . .	274
<b>Neufahrt, A.:</b> Untersuchungen über die Wirkungen von UV- und Röntgenstrahlen auf die Mitose des Eies von <i>Parascaris equorum</i> (Goeze) mit Hilfe des Zeitraffer-films . . . . .	473
<b>Parker, J.:</b> Seasonal Changes in the Physical Nature of the Bark Phloem Parenchyma Cells of <i>Pinus strobus</i> . . . . .	223
<b>Pitschmann, H. und F. Scheminzky:</b> Über die Entstehung von Traubeschen Ferro-ferrieryanzellen bei der Berlinerblau-Mikroreaktion auf Eisen . . . . .	409
<b>Rosser, W.:</b> Licht- und elektronenoptische Untersuchungen über den Einfluß von Streptomycin auf <i>Sinapis alba</i> L. . . . .	580
<b>Sauer, H.:</b> Über die Einwirkung von kurzwelligem Licht auf die basischen Vital-farbstoffe Neutralrot, Pyronin und Janusgrün B . . . . .	518
<b>Strügger, S. und L. Kriger:</b> Untersuchungen über die Struktur der Plastiden etiolierter Pflanzen . . . . .	230
<b>Umrath, K.:</b> Durch Elektrolytverschiebungen im Zellinnern ausgelöste Veränderungen der elektrischen Spannung am Plasmalemma von <i>Nitella mucronata</i> . . . .	212
<b>Url, W.:</b> Rosettensystrophe in Thioharnstoff-Zucker-Mischlösungen . . . . .	260

<b>Weixl-Hofmann, Hertha:</b> Über bemerkenswerte Entwicklungsformen bei <i>Candida albicans</i> und ihre Färbbarkeit mit Nilblau . . . . .	385
<b>Wohlfarth-Bottermann, K. E.:</b> Protistenstudien X. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Amöbe <i>Hyalodiscus simplex</i> n. sp. . . . .	58
<b>Ziegler, Annemarie:</b> Plastiden- und Stärke-Fluorochromierung mit Uranin . . . . .	618

### Kurze Mitteilungen

<b>Ryczkowski, M.:</b> Observations on the Osmotic Value of the Sap of the Central Vacuole of Ovules . . . . .	657
— Viscosity of Central Vacuole Sap of Ovules . . . . .	660
<b>Schmidt, W. A. K.:</b> Über den Gaswechsel von Normal- und crown-gall-Tumorgewebe von <i>Datura innoxia</i> Mill. in vivo . . . . .	143

### Sammelreferate

<b>Höfler, K.:</b> Permeability of Protoplasm . . . . .	145
<b>Kinzel, H.:</b> Neuere Erkenntnisse über Energiewechsel und Makromolekülsynthese der Zelle . . . . .	669
<b>Levitt, J.:</b> In Defense of the Plasma Membrane-Theory of Cell Permeability . . . . .	161
<b>Maramorosch, K.:</b> Leafhopper-transmitted Plant Viruses . . . . .	457
<b>Pfeiffer, H. H.:</b> Bericht über das Treffen der Biorheologen 1959 in Oxford (England) . . . . .	662
<b>Stadelmann, E. J.:</b> Results of Improved Applications of the Plasmometric Method for Permeability Research . . . . .	157

<b>Referate</b> . . . . .	164, 306, 467, 689
---------------------------	--------------------



Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt:

Fetzmann, Elsalore: Beobachtungen an Inhaltskörpern von <i>Callithamnion granulatum</i> . . . . .	19. 2. 1960
Burian, K.: Über Chloroplastenkontraktion bei <i>Closterium lunula</i> und deren Reversibilität . . . . .	4. 3. 1960
Wehrmeyer, W.: Untersuchungen zur Spaltöffnungs-doppelbildung . . . . .	11. 3. 1960
Jarosch, R.: Das Characeen-Protoplasma und seine Inhaltkörper (I. Lichtmikroskopischer Befund) . . . . .	8. 3. 1960
Zurzycki, J., und W. Starzecki: Photosynthesis of <i>Helodea canadensis</i> after Vital Staining with Rhodamine B . . . . .	18. 3. 1960
Nakazawa, S.: Dynamics of Morphogenetic Fields . . . . .	22. 3. 1960
Käppner, W.: Bewegungsphysiologische Untersuchungen an der Amöbe <i>Chaos chaos</i> L. . . . .	26. 3. 1960
Thaler, Irmtraud: Virus-Eiweißkristalle in <i>Phajus grandifolius</i> . . . . .	26. 3. 1960
Kiermayer, O.: Elektive Vitalfärbung der Sekretidioblasten von <i>Helianthus annuus</i> . . . . .	31. 3. 1960
Lamprecht, Ingrid: Die Feinstruktur der Plastiden von <i>Tradescantia albiflora</i> (Kth.) bei Eisenmangelchlorose (I. Lichtmikroskopische Untersuchungen) . . . . .	8. 4. 1960
Lamprecht, Ingrid: Die Feinstruktur der Plastiden von <i>Tradescantia albiflora</i> (Kth.) bei Eisenmangelchlorose (II. Elektronenmikroskopische Untersuchungen) . . . . .	8. 4. 1960
Thaler, Irmtraud: Virus-Einschlüsse in <i>Fritillaria Meleagris</i> L. . . . .	24. 4. 1960
Pavletić, Z., und H. Lieth: Die Entwicklung von <i>Lophocolea</i> -Arten nach einer kurzzeitigen Plasmolysebehandlung . . . . .	28. 4. 1960
Blebl, R., W. Url und Gertrude Janeček: Untersuchungen über chemischen Strahlenschutz an Pflanzenzellen . . . . .	3. 5. 1960
Kelbitsch, Helga: Crown gall an viruskranken Pflanzen . . . . .	6. 5. 1960
Moldenhauer Brooks, Matilda: Nicotine as a Redox-reducing Reagent Producing Abnormal Growth in Animal Cells . . . . .	12. 5. 1960
Horie, K.: The Behavior of the Petals in the Fading of the Flowers of <i>Tradescantia reflexa</i> . . . . .	14. 5. 1960
Olszewska, Maria J.: Recherches autoradiographiques sur la formation du phragmoplaste . . . . .	23. 5. 1960
Olszewska, Maria J.: L'effet du $\beta$ -mercaptoéthanol et de l'urée sur la structure du phragmoplaste . . . . .	28. 5. 1960
Straus, W.: Studies on Chromoplasts of Carrot . . . . .	10. 6. 1960
Oppenheimer, H. R., und B. Jacoby: Usefulness of Autofluorescence Tests as Criterion of Life in Plant Tissues . . . . .	17. 6. 1960
Arndt, E. A.: Professor Dr. Josef Spök 65 Jahre alt . . . . .	24. 6. 1960
Werth, W.: Vergleichende Untersuchungen über die relative Permeabilität des Protoplasmas für Alkohol und Wasser . . . . .	27. 6. 1960
Tazawa, M.: Weitere Untersuchungen zur Osmoregulation der <i>Nitella</i> -Zelle	28. 6. 1960
Reiter, L.: Viruskristalle in Nelken . . . . .	7. 7. 1960
Ziegler, Annemarie: Spindelförmige Inhaltkörper in den Zellen von <i>Nitophyllum</i> . . . . .	9. 7. 1960
Wohlfarth-Bottermann, K. E.: Cytologische Studien VII. Strukturaspekte der Grundsubstanz des Cytoplasmas nach Einwirkung verschiedener Fixierungsmittel . . . . .	12. 7. 1960

Fortsetzung auf der IV. Umschlagseite

Fortsetzung von der III. Umschlagseite

<b>Käppner, W.:</b> Bewegungsphysiologische Untersuchungen an der Amöbe <i>Chaos chaos</i> L. (II. Die Wirkung von Salyrgan, Cystein und ATP) . . .	14. 7. 1960
<b>Kinzel, H., und R. Imb.:</b> Über Vitalfärbung stark saurer Zellsäfte und eine Methode zur pH-Bestimmung in vivo . . . . .	15. 7. 1960
<b>Kenda, Griseldis:</b> Einschlusskörper in den Epidermiszellen von <i>Chlorophytum comosum</i> . . . . .	20. 7. 1960
<b>Schneider, L.:</b> Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von Strahlen auf das Cytoplasma. (I. Die Frühwirkungen von Röntgenstrahlen auf das Cytoplasma von <i>Paramecium</i> ) . . . . .	20. 8. 1960
<b>Schneider, L.:</b> Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von Strahlen auf das Cytoplasma. (II. Die Spätwirkung von Röntgenstrahlen auf das Cytoplasma von <i>Paramecium</i> ) . . . . .	20. 8. 1960
<b>Sitte, P.:</b> Zum Bau der Plastidenzentren in Wurzelproplastiden . . . . .	28. 8. 1960
<b>Parker, J., und D. E. Philpott:</b> An Electron Microscopic Study of Chloroplast Condition in Summer and Winter in <i>Pinus strobus</i> . . . . .	28. 8. 1960
<b>Miličić, D., und Z. Udjbinac:</b> Virus-Eiweißspindeln der Kakteen in Lokalisationen von <i>Chenopodium</i> . . . . .	15. 9. 1960
<b>Klima, J., und R. Jarosch:</b> Das Characeen-Protoplasma und seine Inhaltskörper. II. (Elektronenmikroskopischer Befund) . . . . .	20. 9. 1960
<b>Blochinger, A.:</b> Die Wirkung cancerogener und setrogener Stoffe auf Pflanzen . . . . .	22. 9. 1960
<b>Falke, D., und J. - E. Richter:</b> Phasenkontrastmikroskopische Befunde zur Bildung mehrkerniger Kulturzellen . . . . .	8. 10. 1960

## Archiv für die gesamte Virusforschung

Herausgegeben von S. Gard, Stockholm, C. Hallauer, Bern, K. F. Meyer, San Francisco, E. G. Nauck, Hamburg, A. B. Sabin, Cincinnati  
Schriftleitung: C. Hallauer, Bern

Zuletzt erschien:

**Band X, Heft 2.** (Abgeschlossen im Juli 1960.) Mit 47 Textabbildungen. 137 Seiten. 1960.  
S 210.—, DM 35.—, sfr. 35.80, \$ 8.35

**Inhaltsverzeichnis:** Ruska, H. Gustav-Adolf Kausche zum Gedächtnis. — Prinzie, A., E. Schonne et P. De Somer. Inactivation et spécificité cellulaire de l'acide ribonucléique du poliovirus. — Gibbels, Ellen, W. Scheid und R. Ackermann. Über die diaplasentäre Übertragung neutralisierender Antikörper gegen die Poliomyelitoviren. — Ackermann, R. Über die Züchtung des Virus der lymphocytären Choriomeningitis in Mäuseembryo-Zellkulturen. — Maass, G., und K. Mannweiler. Cytologische und biologische Untersuchungen über das Verhalten des Mumps-Virus in Affenierenepithelkulturen. — Siegel, B. V., and S. W. French. Histologic Study of Chick Embryos for Death Causation Following Chorioallantoic Inoculation with Canary Pox Virus. — Wigand, R., und G. Nielsen. Zur Frage der Existenz löslicher und virusgebundener Anteile von komplementbindendem Antigen und Hamagglutinin des Vaccinavirus. — Mayr, A., und A. Herrlich. Züchtung des Variolavirus in der infantilen Maus. — Bonitz, K., und K. Seelemann. Pockenimpfstoff aus Gewebekulturen. — Weissenberg, R. Some Remarkable Osmiophilic Structures of the Inclusion Bodies in the Lymphocystis Virus Disease of the European Flounder. — Hallauer, C., und G. Kronauer. Nachweis von Gelbfiebervirus-Haemagglutinin in menschlichen Explantaten.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

